

Untersuchungen zum Mechanismus der
Blüteninduktion bei der
Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* L.

Erich Warm

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0027

Untersuchungen zum Mechanismus der
Blüteninduktion bei der
Langtagpflanze Hyoscyamus niger L.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Diplom-Biologe Erich Warm
aus
München

November 1977

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 1.2.1978



Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und allgemeine Methode	9
2.1.	Pflanzenmaterial	9
2.1.1.	Anzucht von <i>Hyoscyamus niger</i> und <i>Pharbitis nil</i>	9
2.1.2.	Auswertung der Versuchspflanzen	10
2.1.3.	Belichtungsversuche	11
2.2.	Lichttechnische Methoden	12
2.2.1.	Photometrische Grundlagen	12
2.2.2.	Herstellung von monochromatischem Licht	14
3.	Untersuchungen über die Natur des Photorezeptors	16
3.1.	Beteiligung des Phytochromsystems	16
3.1.1.	Photoperiodische Reaktion auf Weißlicht	16
3.1.2.	Niederenergiereaktion	18
3.1.3.	Hochenergiereaktion	25
3.2.	Beteiligung der Photosynthese	29
3.2.1.	Photosyntheserate unter verschiedenen Beleuchtungsstärken	30
3.2.1.1.	Methode	30
3.2.1.1.1.	Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ an intakten Pflanzen	30

3.2.1.1.2.	Extraktion des radioaktiv markierten Materials	30
3.2.1.1.3.	Bestimmung der Radioaktivität	31
3.2.1.2.	Ergebnisse	31
3.3.	Beteiligung der Photosynthese bei der Blühinduktion durch Farblight	33
4.	Untersuchungen über die chemische Natur des Blühhormons	37
4.1.	Wirkung von Salicylsäure, Aspirin und Phytohormonen bei Infiltration in die Blätter	37
4.1.1.	Methode	38
4.1.2.	Infiltration von Salicylsäure und Aspirin	39
4.1.3.	Infiltration von Phytohormonen	40
5.	Einfluß blühinduzierender Bedingungen auf das Proteinnmuster im Blatt	46
5.1.	Auftrennung der Blattproteine durch Gelfiltration	47
5.1.1.	Material und Methode	47
5.1.1.1.	Radioaktive Markierung der Pflanzen mit ^{14}C -Leucin	47
5.1.1.2.	Extraktion der leichtlöslichen Proteine	47
5.1.1.3.	Gelfiltration über Sephadex G 200	48
5.1.2.	Ergebnisse	49
5.2.	Auftrennung der Blattproteine mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese	52
5.2.1.	Methode	52
5.2.1.1.	Elektrophorese der leichtlöslichen Proteine	52
5.2.1.2.	Elektrophorese der schwerlöslichen Proteine	55
5.2.2.	Ergebnisse	57
5.2.2.1.	Auftrennung der löslichen Blattproteine	57
5.2.2.2.	SDS-Elektrophorese der schwerlöslichen Proteine	63

6.	Einfluß blühinduzierender Bedingungen auf die Aktivität einiger Enzyme im Blatt	65
6.1.	Methode	66
6.2.	Ergebnisse	67
7.	Induktion der Blütenbildung durch Cycloheximid	70
7.1.	Wirkung von Cycloheximid auf die Blühinduktion	71
7.1.1.	Additive Wirkung von CHI-Infiltration und photoperiodischer Behandlung	71
7.1.2.	Einfluß von CHI auf die durch Gibberellin ausgelösten Induktionsvorgänge	73
7.2.	Differentielle Hemmung der Aufnahme und des Einbaus von Aminosäuren durch Cycloheximid	74
7.2.1.	Einfluß von Cycloheximid auf die Netto-CO ₂ -Fixierung	76
7.2.2.	Vergleich des Einbaus von ¹⁴ CO ₂ und ¹⁴ C- Leucin nach Einwirkung von Cycloheximid	77
8.	Diskussion	82
9.	Zusammenfassung	96
10.	Literaturverzeichnis	100

Verwendete Abkürzungen

Amo 1618	= 2-Isopropyl-4-dimethylamino-5-methylphenyl-1-piperidin-carboxylat-methyl-chlorid
ATP	= Adenosintriphosphat
Butyl-PBD	= 2-(4-t-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,2,3-oxadiazol
CCC	= 2-Chloräthyl-trimethyl-ammoniumchlorid
CHI	= Cycloheximid (= Actidion)
DCMU	= 3-(3,4)-dichlorphenyl-1,1-dimethyl-Harnstoff
DMSO	= Dimethylsulfoxid
G-6-PDH	= Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPT	= Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H.n.	= Hyoscyamus niger L.
KTP	= Kurztagpflanze
LTP	= Langtagpflanze
mM	= millimolar
m-RNS	= messenger-Ribonukleinsäure
NADH	= $\text{NADH} + \text{H}^+$ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form
NADPH	= $\text{NADPH} + \text{H}^+$ = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduzierte Form
3-PGS	= 3-Phosphoglycerinsäure
PPO	= 2,5-Diphenyloxazol
PVP	= Polyvinylpyrrolidon
SDS	= Natriumlaurylsulfat
TCA	= Trichloressigsäure
Tris	= Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
2-TU	= 2-Thiouracil

1. Einleitung

Der vielleicht entscheidendste Entwicklungsschritt im Leben einer Pflanze ist der Übergang von der vegetativen zur reproduktiven Phase. Diese tiefgreifende morphologische Veränderung zeigt sich in der Ausbildung generativer Organe, die der Erhaltung und Ausbreitung der Art dienen sollen. Um diese Aufgabe optimal zu erfüllen, ist nicht nur die Gestaltung der Blüten, sondern auch der Zeitpunkt ihrer Anlage als Folge fortwährenden Selektionsdrucks den Umweltbedingungen hervorragend angepasst.

Während die Umwelt in den Tropen weitgehend konstant ist, wird diese in den gemäßigten Zonen von einem Jahresgang bestimmt; er wird deutlich in rhythmischen Veränderungen der Niederschlagsmenge, der Temperatur, der Lichtintensität und der Tageslänge. Welche dieser Faktoren am besten als äußere Uhr für den Blühzeitpunkt geeignet sind, richtet sich nach der Regelmäßigkeit ihrer Rhythmik.

Durch einen schnellen, einjährigen Entwicklungszyklus können sich Blütenpflanzen Bedingungen anpassen, die sehr lebensgünstige und sehr lebensfeindliche Abschnitte besitzen. Bei regelmäßig wiederkehrenden längeren Frostperioden ist eine Regulation des Blühzeitpunktes durch tiefe Temperatur optimal, um die empfindlichen Blütenanlagen erst nach der kalten Jahreszeit zu entwickeln. Diese unter dem Begriff "Vernalisation" bekannte Blühregulation ist bei den Wintergetreiden und vielen biennen Pflanzen anzutreffen.

Photoperiodismus

Zusätzlich zur Frostbehandlung benötigen vernalisationsbedürftige Pflanzen einen zweiten "Zeitgeber", der den Blühtermin auch bei vielen anderen steuert, nämlich die jahreszeitlichen Veränderungen der Tageslänge. GARNER und ALLARD (1920) führten für dieses Regulationsprinzip den Begriff "Photoperiodismus" ein. Die Beobachtung, daß sich bei einigen Pflanzen die Blütenbildung durch eine Verlängerung, bei anderen durch eine Verkürzung der täglichen Lichtzeit fördern läßt, führte zu einer Einteilung dieser sich gegensätzlich verhaltenden Typen in Langtagpflanzen (LTP) und Kurztagpflanzen (KTP) (GARNER und ALLARD, 1925). Die Förderung der Blütenbildung kann so ausgeprägt sein, daß bei den qualitativ reagierenden LTP eine Blütenbildung unterhalb einer genau festgelegten Tageslänge (kritische Tageslänge), bei KTP oberhalb einer solchen, nicht mehr stattfindet. Wenn die induzierende Lichtperiode für eine bestimmte, spezifische Anzahl von Tagen besteht, werden Blütenanlagen gebildet, unabhängig davon, ob die Pflanze weiterhin blühfördernde Tageslängen erhält; dies zeigt, daß die Blühinduktion über einen "Schaltermechanismus" irreversible Prozesse in Gang setzt, die dann zur Differenzierung von Blütenanlagen führen. Dabei stellt sich die Frage nach dem Ort der Zeitmessung und der Blühantwort. Umfangreiche Forschungen machen deutlich, daß die Photoinduktion in den Blättern erfolgt, obgleich der Vegetationspunkt das die Induktion realisierende Organ ist.

Blühhormon

Aufgrund der räumlichen Trennung der beiden Vorgänge entwarf CHAILAKHYAN (1936) das Blühhormon-Konzept. Die erfolgreiche Induktion vegetativer Pflanzen durch Aufpfropfen induzierter Blätter (LANG und MELCHERS, 1948) bestätigte die Existenz eines vermittelnden Blühstimulus, des sogenannten "Florigen". Deutliche Hinweise auf den Hormoncharakter ergaben sich aus Experimenten, in welchen Donorblätter des einen Tageslängentyps Blüteninduktion in Rezeptorpflanzen des anderen Typs auslösten; dies spricht dafür, daß das Hormon für LTP und KTP

identisch ist. Diese spezifische, während der Induktion gebildete Substanz wandert im Phloem parallel mit dem Assimilatstrom zum Vegetationspunkt (KING und ZEEVART, 1973; CHAILAKHYAN und KHLOPENKOVA, 1973). Durch Abschneiden der Blätter verschiedene Zeit nach der Induktion wurde an einigen Pflanzen die Transportgeschwindigkeit untersucht (SALISBURY, 1957; EVANS und WARDLAW, 1966). Der Transport des Stimulus beginnt z.B. bei *Sinapis* 16 Stunden nach Start eines induktiven Langtages und erreicht das Apikalmeristem nach weiteren 2 Stunden (KINET et al., 1971). Trotz dieser vielen Hinweise für die Existenz des Blühhormons schlugen bislang alle Versuche fehl, den Stimulus aus induzierten Blättern zu extrahieren und zu analysieren. LINCOLN, MAYFIELD und CUNNINGHAM (1961) erhielten nach Methanol-extraktion blühender *Xanthium*-Pflanzen einen Rohextrakt, der einen Teil der vegetativen induzierte; andererseits veröffentlichten HODSON und HAMNER (1970), daß ein Acetonextrakt der gleichen Pflanzen zwar vegetative Pflanzen von *Lemna gibba* induzierte, bei vegetativen *Xanthium* dagegen keine Blütenbildung auslöste. Mit Hilfe der Aphidentechnik gewannen CLELAND und AJAMI (1974) ein Phloemexsudat aus blühenden *Xanthium*-Pflanzen, das sie an *Lemna* im Biotest einsetzten; die blühinduzierende Eigenschaft der darin gefundenen Salicylsäure ließ sich jedoch nicht weiter bestätigen (PIETERSE, 1976). Auch Berichte über blühfördernde Eigenschaften von Aspirin (BHALLA und SABHARWAL, 1975), von Acetylcholin (KANDELER, 1972) und Östrogenen (KOPCEWICZ, 1972) ließen sich entweder nicht auf andere Pflanzen übertragen, oder die Substanzen wirkten nur in Verbindung mit Phytohormonen (KOPCEWICZ und PORAZINSKY, 1974).

Schon die früheren Mißerfolge, das Blühhormon zu isolieren, führten v. DENFFER (1950) zu der Frage, ob die Induktion der Blütenbildung nicht als Inaktivierung eines Hemmstoffes betrachtet werden könnte, welcher den Vegetationspunkt unter nichtinduzierenden Bedingungen an der Blütenbildung hindert. Diese "Hemmstoff-Hypothese" wurde durch die Tatsache, daß bei der LTP *Hyoscyamus niger* eine Totalentblätterung auch unter nichtinduzierenden Bedingungen Blütenbildung auslöste, sowie

durch weitere indirekte Hinweise unterstützt. Von einigen Autoren wird deshalb eine Kombination des "Blühhormon-Konzepts" mit der "Hemmstoff-Hypothese" diskutiert. (Zusammenfassung und Literatur siehe WELLENSIEK, 1959 und EVANS, 1969).

Eine noch weiter gehende Negierung der "Blühhormon-Hypothese" führte zu der verschiedentlich vertretenen Ansicht (Zusammenfassung siehe ZEEVART, 1976), daß es gar keine spezifischen Regulatoren der Blütenbildung gibt, sondern daß der Umschlag des Vegetationspunktes von einem bestimmten Verhältnis der bereits bekannten Phytohormone im Apikalmeristem gesteuert wird.

Für die Blütenbildung kommt unter den Phytohormonen den Gibberellinen eine besondere Bedeutung zu: Bei vernalisationsbedürftigen Pflanzen können sie die Kältebehandlung oder den nachfolgenden Langtag ersetzen, selten jedoch beide Bedingungen zugleich; keine Berichte gibt es dagegen, wonach Gibberelline den Kurztag ersetzen. Da sie bei rosettigen LTP Blütenbildung und die daran gekoppelte Sproßstreckung (Schossen) auslösen, folgt LANG (1957), daß Gibberelline sekundär über die Sproßstreckung wirken.

Photorezeptoren und Zeitmessung

Während das hypothetische "Florigen" die Informationsübertragung vom Blatt zum Apikalmeristem vermittelt, bilden den Anfang dieser Reaktionskette Vorgänge im Blatt, welche unmittelbar durch das Licht ausgelöst werden. Die Beantwortung unterschiedlicher Tageslängen setzt voraus, daß diese wahrgenommen und gemessen werden. Dazu sind Photosysteme befähigt, welche durch Lichtabsorption energetisch angeregt werden (Photorezeptoren) und dadurch eine Kette von Folgeprozessen auslösen. Die Entdeckung von HAMNER und BONNER (1938), daß eine kurze Lichtgabe in der Mitte der einem induktiven Kurztag folgenden langen Nacht ("Störlicht") die Induktion bei KTP ebenso aufheben kann wie ein Langtag, führte dazu, die Wellenlängenabhängigkeit dieses Störlichts zu untersuchen (PARKER et al., 1945, 1946).

Die maximale Wirksamkeit von Wellenlängen um 660 nm, die Möglichkeit der Reversion durch dunkelrotes Licht (730 nm) sowie der geringe Energiebedarf beider Reaktionen trugen entscheidend zur Entdeckung des Phytochromsystems bei und ließen zunächst die photoperiodische Steuerung der Blütenbildung als "klassische" Phytochromreaktion erscheinen. Schon die ersten entsprechenden Untersuchungen über den "Störlicht"-Effekt zeigten allerdings, daß zur Induktion bei LTP viel höhere Strahlungsenergien erforderlich sind, als für die Verhinderung der Blütenbildung bei KTP; eine Erkenntnis, die danach vielfach bestätigt wurde, bei der Darstellung in Lehrbüchern aber kaum berücksichtigt wird.

Bei Belichtung über längere Zeiträume und mit höherer Energie fanden als erste STOLWIJK und ZEEVART (1955) sowie MEIJER (1957), daß nicht etwa HR, sondern DR und Blau einen Langtag bewirken. Dieser Unterschied in der Wellenlängenabhängigkeit zwischen Kurzzeit- und Langzeitbestrahlung wurde in der Folgezeit bei zahlreichen anderen photomorphogenetischen Vorgängen gefunden und führte zu der Annahme, daß die sogenannte "Hochenergiereaktion" (HER) und die "Niederenergiereaktion" (NER) über verschiedene Mechanismen wirken und daß bei der HER außer Phytochrom noch ein "Blau-Rezeptor" beteiligt ist (Zusammenfassung und Diskussion siehe GRILL und VINCE, 1965; MOHR et al., 1974; RAU, 1975). Bei der Blütenbildung werden die Verhältnisse noch dadurch komplizierter, daß auch photosynthetische Prozesse an der Induktion beteiligt zu sein scheinen (SCHUSTER und KANDELER, 1970; SCHNEIDER und STIMSON, 1972).

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu diesem Problemkreis in den letzten Jahren zeichnet sich bis heute noch keine Lösung ab (Zusammenfassung und Diskussion siehe VINCE, 1972; ZEEVART, 1976). Das gleiche gilt für die Frage des Zeitmeßmechanismus. Hier konkurrieren - unabhängig von der Natur der Photorezeptoren - zwei Ansichten miteinander: Nach BÜNNINGS Hypothese (Literatur 1963) wäre die Zeitmessung in photoperiodischen Reaktionen an eine endogene Tagesrhythmik gekoppelt, an der möglicherweise phytochrommodulierte Oscillationen des Energie-

stoffwechsels beteiligt sein können (FROSCH und WAGNER, 1972); die andere Hypothese nimmt eine Zeitmessung nach dem "Sanduhr-Prinzip" an (Zusammenfassung siehe VINCE, 1972).

Stoffliche Veränderungen im Blatt

Die tiefgreifenden morphologischen Umgestaltungen, welche durch die photoperiodische Umsteuerung ausgelöst werden, sind vermutlich begleitet von spezifischen Veränderungen der Genfunktion, entweder einer Stimulierung bestimmter inaktiver Gene oder selektiver Inaktivierung von Genrepressoren zu entsprechenden Zeiten und Orten der DNS-Kette (SEARLE, 1965). Dieser folgen transskriptorische und translatorische Vorgänge, die an stadienspezifischen m-RNS- und Proteinsynthesen erkennbar sind; als Beispiel dafür sei das vom Keimlingsstadium abhängige RNS-Muster in Erdnußkotyledonen erwähnt (KEY und INGLE, 1966). In gleicher Weise könnte die Blühinformation (mit einer de-novo Synthese von Blühstimulus) im genetischen Material der Pflanze latent enthalten und durch induzierende Bedingungen abrufbar sein.

Erste Anhaltspunkte dafür ergaben sich durch die Verwendung von Hemmstoffen des Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsels. SALISBURY (1959) konnte die Blühinduktion mit dem Basenanalogen 5-Fluoruracil (5-FU) hemmen, wenn er es während der induktiven Dunkelperiode den Blättern von *Xanthium* applizierte. Die Revertierbarkeit der Hemmwirkung mittels Orotsäure spricht für den spezifischen Effekt auf die Nukleinsäuresynthese. Inzwischen wurden entsprechende Wirkungen auch an mehreren anderen Pflanzen gefunden, wie *Chenopodium rubrum* und *Lolium temulentum* (TELTSCHEROVA et al., 1967), oder *Sinapis alba* (BERNIER, 1969).

Bei der LTP *Hyoscyamus niger* ließ sich dagegen die Blütenbildung mit 2-Thiouracil (2-TU), ebenfalls einem Basenanalogen, nur hemmen, wenn die Lösung auf den Vegetationspunkt aufgetragen wurde; bei Infiltration in die Blätter löste es dagegen eine Blütrate von ca. 80% im nichtinduktiven Kurztag aus. Die

Wirkung wurde damit erklärt, daß 2-TU die Synthese des Blühstimulus im Blatt auslöst (EICHHOFF und RAU, 1969). Analog ließ sich mit dem Proteinsynthesehemmstoff Cycloheximid (Actidion, CHI) bei Infiltration in die Blätter eine Blütrate von 60% induzieren; eine Applikation auf den Vegetationspunkt hemmte dagegen die Blütenbildung (KLAUTKE und RAU, 1973). Die blüh-auslösende Wirkung der beiden Antimetaboliten ist schwer mit einer Hemmung der Transskription und Translation zu erklären; da CHI und 2-TU in den blühwirksamen Konzentrationen die Proteinsynthese, gemessen am ^{14}C -Leucin-Einbau erst nach längerer Zeit hemmen, kommen auch andere Möglichkeiten der Induktionswirkung in Betracht (KLAUTKE und RAU, 1974).

In den letzten Jahren wurde vereinzelt versucht, Veränderungen in der Zusammensetzung von Nukleinsäuren und Proteinen nach photoperiodischer Induktion nachzuweisen. Die wenigen Veröffentlichungen zeigen eher ein widersprüchliches Bild. Während JACQUARD et al. (1975) am Vegetationspunkt von Senfpflanzen ein neusynthetisiertes Protein nach Langtaginduktion fanden, gibt es keinen Hinweis, daß auch in den Blättern eine de-novo-Synthese erfolgt (SAWHNEY et al., 1976). SHERWOOD et al. (1971) konnten auch nach Doppelmarkierung der Proteine weder qualitative noch quantitative Unterschiede im Proteinstmuster von Xanthiumblättern entdecken.

Ziele der Arbeit

Bei der Zusammenfassung der bis vor kurzem vorliegenden Ergebnisse und Hypothesen über die photoperiodische Steuerung der Blütenbildung kommt ZEEVART (1976) zu der Meinung "...that more is known about the action of the floral stimulus than about its produktion and chemical nature" und weiter "We are still pretty much in the dark about the inductive processes in the leaves." Nachdem sich bei der qualitativ reagierenden ITP Hyoscyamus niger die Prozesse am Vegetationspunkt und im Blatt durch den Rosettenwuchs sehr gut voneinander trennen lassen (EICHHOFF und RAU, 1969; KLAUTKE und RAU, 1973) und zudem bereits viele Untersuchungen an dieser Art

vorliegen, sollte in dieser Arbeit versucht werden, zur Aufklärung der Vorgänge im Blatt während der photoperiodischen Induktion beizutragen. Dabei sollten vor allem folgende Teilprobleme angegangen werden: Durch die Anwendung von Störlicht und Zusatzlicht verschiedener spektraler Bereiche sollte geklärt werden, inwieweit NER und HER an der Induktion beteiligt sind; dieses Problem resultiert aus den Befunden, daß für diese Induktion bei Störlicht weit mehr Versuchszyklen erforderlich sind als bei Dauerlicht. Zusätzlich ergibt sich auch die Frage nach der Bedeutung der Photosynthese beim Induktionsvorgang. Weiterhin sollte die Wirkung verschiedener als blühfördernd beschriebener Substanzen und Phytohormone durch direkte Zufuhr in die Blätter überprüft werden. Mögliche Änderungen im Proteinmuster im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion sollten durch radioaktive Markierung und Fraktionierung der Blattproteine gesucht werden. Schließlich sollte versucht werden, bei der durch Infiltration mit dem Hemmstoff Cycloheximid bewirkten Blütenbildung ("Chemoinduktion") zu klären, welche Rolle dieser Hemmstoff bei den Vorgängen im Blatt spielt, um damit möglicherweise Anhaltspunkte für die Bildung des Blühstimulus zu erhalten.

2. Material und allgemeine Methode

2.1. Pflanzenmaterial

2.1.1. Anzucht von *Hyoscyamus niger* und *Pharbitis nil*

Für alle Versuche mit *Hyoscyamus niger* (H.n., Bilsenkraut, Solanaceae) wurde die einjährige, gelbblühende Rasse verwendet. Das Samenmaterial war 1937 von MELCHERS isoliert und durch fortwährende Selbstbestäubung nachgezogen worden. *Hyoscyamus niger* ist eine qualitative LTP mit einer kritischen Tageslänge von etwa 11 Stunden und bleibt unter Kurztagbedingungen strikt vegetativ. Zur Kontrolle der Langtagwirkung einzelner Versuchsansätze wurde auch die qualitativ reagierende Kurztagpflanze *Pharbitis nil* (Convolvulaceae) verwendet. Samen der photoperiodisch sensitivsten Rasse "violet" wurden von der Marutane Co., Kyoto (Japan) bezogen.

Die Samen von H.n. keimten in gesiebter Gartenerde. Nach etwa 10 Tagen wurden die Schößlinge in Tonschalen pikiert und nach weiteren 4 Wochen einzeln in Tontöpfe von 8 Zentimetern Durchmesser versetzt. Bis zur Verwendung für einen Versuch und anschließend bis zur Auswertung standen die Pflanzen im Gewächshaus bei einer mittleren Temperatur von 22 bis 24°C bei Tag und 15 bis 20°C bei Nacht. Zur Erzielung eines Kurztages wurde die tägliche Lichtperiode durch Dunkelstürze auf 8 bis 10 Stunden begrenzt. In der lichtarmen Jahreszeit und zur Erzielung eines Langtages wurde das natürliche Licht durch Glühlampen (Typ Philips "Comptalux", 300 Watt) ergänzt und

eine Beleuchtungsstärke zwischen 3000 und 5000 Lux eingestellt. Gelegentlich auftretende Pflanzenschädlinge wurden mit Insektiziden (E 605, Metasystox, Rospin) bekämpft. Zwei Wochen vor den Versuchen sowie während der Nachreaktionszeit kamen keine chemischen Substanzen zur Anwendung. Zu Versuchsbeginn waren die Pflanzen 2 bis 3 Monate alt.

Zur Keimung der Samen von *Pharbitis nil* wurde die von TAKIMOTO (1967) beschriebene Methode angewendet, die jedoch bei unserem Material eine sehr ungleichmäßige Keimung ergab. Ein besseres Ergebnis wurde erzielt, wenn die Samen einen Tag in fließendem Wasser gequollen und anschließend in feuchten Sand eingebettet wurden. Die Weiterbehandlung der Keimlinge erfolgte wie bei H.n. Die im 16-stündigen Langtag angezogenen Pflanzen wurden für die Versuche verwendet, wenn das dritte Blatt voll ausgebildet war. Dieser Zeitpunkt war 4 bis 5 Wochen nach der Aussaat erreicht.

2.1.2. Auswertung der Versuchspflanzen

Die *Hyoscyamus*-Pflanzen wurden 4 bis 6 Wochen nach dem jeweiligen Versuchsbeginn unter dem Präpariermikroskop auf das Vorhandensein von Blütenanlagen untersucht. Als Blüherfolg wurde gewertet, wenn der Vegetationspunkt Blütenprimordien entsprechend Abb. 1 ausdifferenziert hatte. Außerdem wurde die Anzahl der nach Versuchsbeginn neu gebildeten Blätter (Blattzuwachs) bestimmt, der nach LANG und MELCHERS (1943) ein Maß für die photoperiodische Induktionsstärke darstellt. Die Schoßhöhe wurde als Abstand von der Rübenoberkante bis zum Vegetationspunkt gemessen.

Die Auswertung der *Pharbitis*-Pflanzen erfolgte, wenn in den Blattachseln für das bloße Auge erkennbare Blütenknospen erschienen waren. Anzahl und Größe der Blütenknospen wurde nicht berücksichtigt.



Abb.1:

Blütenprimordien am Vegetationspunkt von H.n. 30 Tage nach Induktion mit zwei Langtagen. Rechte Abb. stärker vergrößert.

2.1.3. Belichtungsversuche

Für die Belichtungsversuche wurden gut entwickelte, etwa 2 bis 3 Monate alte Pflanzen verwendet, die im Gewächshaus strikt im Kurztag von 10 bis 10 1/2 Stunden gehalten waren. Für die Dauer des Belichtungsversuchs wurden die Pflanzen in Belichtungsräume gebracht, deren Temperatur auf $22 \pm 1^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit auf 70 bis 80% eingestellt war. Nach Versuchsende wurden die Pflanzen zur Nachreaktion unter Kurztagbedingungen ins Gewächshaus zurückgebracht. Die Auswertung erfolgte nach 4 bis 6 Wochen.

2.2. Lichttechnische Methoden

Auch bei neueren Arbeiten, die sich mit der Lichtwirkung auf Pflanzen beschäftigen, haben die inzwischen international üblichen photometrischen Einheiten und Nomenklaturen noch nicht völlige Anwendung gefunden. Dies ergibt sich auch häufig aus der Schwierigkeit, die qualitativen und quantitativen Eigenschaften des verwendeten Lichtes zu messen. Um unsere Ergebnisse mit denen anderer Autoren vergleichen zu können, war in vielen Fällen eine Umrechnung erforderlich, auf deren Grundlage alle hier verwendeten Lichtbedingungen standardisiert werden.

2.2.1. Photometrische Grundlagen

Zur Begriffsklärung der in den folgenden Abschnitten angegebenen Einheiten soll deshalb kurz auf einige physikalische Grundlagen der Lichtmessung eingegangen werden.

Der Energieinhalt der Lichtquanten (in erg oder Elektronenvolt, eV) ist umgekehrt proportional der Wellenlänge der elektromagnetischen Schwingungen. Die von einer Strahlungsquelle in der Zeiteinheit t nach allen Seiten emittierte Strahlungsenergie, der Strahlungsstrom P , ist eine physikalische Größe und z.B. mittels einer Thermosäule meßbar. Für Lebewesen sind nun aber die elektromagnetischen Schwingungen mit Wellenlängen von ca. 300 nm bis 800 nm von besonderer Bedeutung, weil in diesem Bereich die meisten Pigmente absorbieren und dadurch photochemische Reaktionen auslösen; dabei sind - abhängig vom jeweils beteiligten Photorezeptor - für verschiedene photobiologische Prozesse einzelne Spektralbereiche unterschiedlich wirksam ("Wirkungsspektren"). Für die Beleuchtungstechnik spielt naturgemäß das Wirkungsspektrum für den menschlichen Sehvorgang die entscheidende Rolle (siehe Abb. 2); der dafür wirksame Strom ist der "Lichtstrom" (Lumen). Diese in der Lichttechnik vielfach verwendete Größe läßt sich unmittelbar der Beleuchtungsstärke, dem Lichtstrom pro Flächeneinheit (Einheit Lux) zuordnen. Ein Zusammenhang zwischen dem Lichtstrom Φ und dem Strahlungsstrom P kann nach folgender

Formel hergestellt werden:

$$\Phi = \eta_a \cdot P$$

wobei η_a für jede Wellenlänge aus der Eichkurve des Auges ermittelt werden kann (Abb.2). Somit ist der Lichtstrom eine standardisierte physiologische Ableitung des physikalischen Strahlungsstromes.

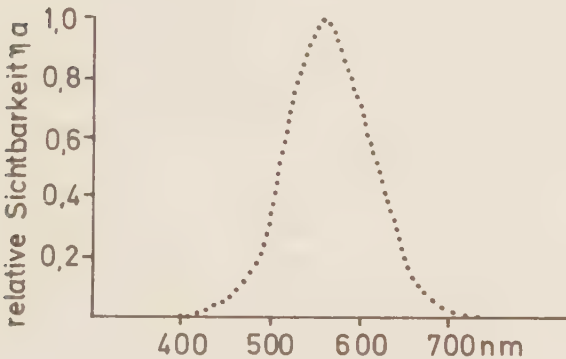


Abb.2:

Wirksamkeit eines energiegleichen Strahlungsstroms auf die Helligkeitsempfindung des durchschnittlichen Menschauges.

Da nun andere photobiologische Prozesse ein vom Sehvorgang verschiedenes Wirkungsspektrum haben, kann für sie die Größe Lux höchstens als relative Einheit (z.B. bei verschiedenem Abstand von der gleichen Lichtquelle) verwendet werden. Für Aussagen über die Wirksamkeit von Licht verschiedener Wellenlängen ist es notwendig, energiegleichen Strahlungsstrom bzw. gleiche Quantenmengen zu verwenden. Der im Gegensatz zur Bestimmung des Lichtstroms weitaus höhere und kompliziertere meßtechnische Aufwand zur Ermittlung des Strahlungsstroms ist deshalb nicht zu vermeiden.

2.2.2. Herstellung von monochromatischem Licht

Das in den Versuchen verwendete Licht des blauen ($\lambda_{\max} 455 \text{ nm}$), des roten ($\lambda_{\max} 661 \text{ nm}$) und des dunkelroten ($\lambda_{\max} 780 \text{ nm}$) Spektralbereichs wurde durch Kombination verschiedener Lichtquellen und Filter auf folgende Weise hergestellt:

- BLAU: Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W Lichtfarbe 18 und Plexiglasfilter Röhlm und Haas Nr.627
- HELLROT: Leuchtstoffröhren Philips TL 40 W Lichtfarbe 15 und Plexiglasfilter Röhlm und Haas Nr.501
- DUNKELROT: Osram Linestra-Röhren 100 Watt und Plexiglasfilter Röhlm und Haas Nr.627(2mal) und Nr.501

Die relative Verteilung des Strahlungsstroms der einzelnen Lichtfarben ist in Abb.3a-c wiedergegeben.

Der auf die Pflanzen auftreffende Strahlungsstrom (=Bestrahlungsstärke) der einzelnen Lichtquellen wurde auf zweifache Weise gemessen:

1. Mit der Moll'schen Großflächenthermosäule Typ E 1 der Fa. Kipp/Delft(Holland) über das Multiflex-Galvanometer MGFO der Fa. Lange, Berlin.

Der Nachteil dieser Meßmethode besteht darin, daß insbesondere bei geringem Abstand zur Lichtquelle auch der Infrarotanteil miterfasst wird. Um diesen Fehler möglichst zu korrigieren, wurde

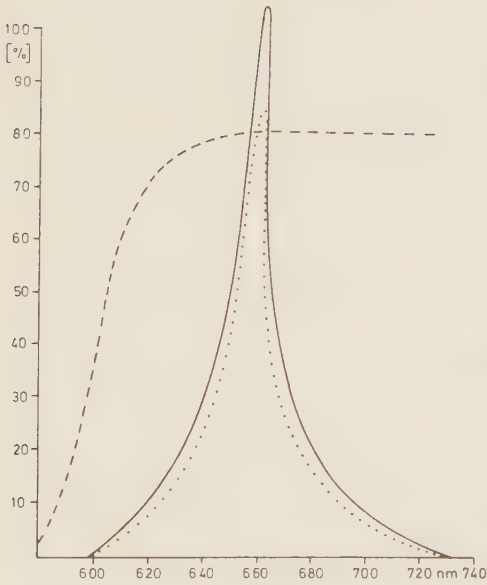
2. die Beleuchtungsstärke (in Lux) mit dem augenkorrigierten Selen-Photoelement S 60A der Fa. Lange gemessen. Mittels einer Eichkurve der spektralen Empfindlichkeit K des Photoelementes läßt sich, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ein mathematischer Zusammenhang zwischen Lichtstrom und Strahlungsstrom herstellen nach der Formel:

$$P = \Phi \times 1 / K_{\lambda}$$

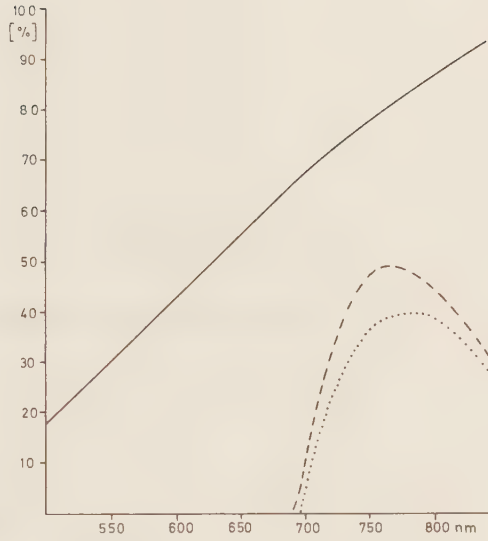
Der Gesamtstrahlungsstrom der Lichtquelle nach Filterung ergibt sich als Integral der Emissionskurven nach der Formel:

$$P_{\text{ges}} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P_{\lambda}$$

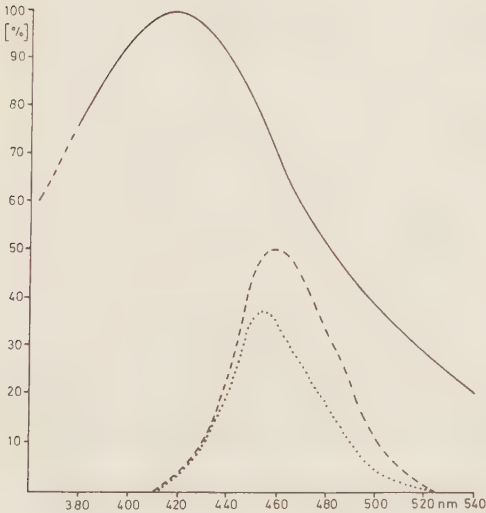
wobei λ_1 und λ_2 die begrenzenden Wellenlängen der Emissionskurve des Strahlungsstroms sind.



3 a)



3 b)



3 c)

Abb.3:

Relative Verteilung des Strahlungsstroms der Lichtquelle vor der Filterung (—) und nach der Filterung (...).

Transmission der Filter(---).

a)Hellrot-Aggregate

b)Dunkelrot-Aggregate

c)Blaulicht-Aggregate

3. Untersuchungen über die Natur des Photorezeptors

3.1. Beteiligung des Phytochromsystems

3.1.1. Photoperiodische Reaktion auf Weißlicht

Um zunächst die photoperiodische Sensitivität unseres Pflanzenmaterials unter Langzeitbelichtung zu prüfen, wurde vor den Versuchen mit Licht verschiedener spektraler Eigenschaften die Reaktion von H.n. auf weißes Dauerlicht untersucht. Dazu wurde in den einem Kurztag folgenden Nächten Zusatzlicht mit Glühlampen (mittlere Beleuchtungsstärke 7000 Lux) gegeben. Die nach einer Gesamtbelichtungsdauer von 1 bis 3 Tagen (1 DLT bis 3 DLT) erhaltene Blütenbildung ist in Tab.1 gezeigt.

Tab.1: Blütrate von H.n. nach Induktion mit 1 bis 3 Tagen weißem Dauerlicht (DLT)

Bedingung	Versuchspflanzen	Blühend			Vegetativ		
		Zahl	%	Blattzuwachs	Zahl	%	Blattzuwachs
1 DLT	30	1	3	20	29	97	23
2 DLT	30	26	87	9	4	13	25
3 DLT	30	29	97	6	1	3	12

Aus den Zahlenwerten von Tab.1 ist ersichtlich, daß H.n. mindestens zwei Tage Dauerlicht benötigt, um induziert zu werden. Mit dem Blüherfolg ist eine signifikante Reduzierung des

Blattzuwaches verbunden, der ein zusätzliches Indiz für die Induktionsstärke ist. Zwar hat auch bei 1 DLT eine Pflanze Blütenprimordien ausgebildet; der Blattzuwachs, welcher den vegetativen Pflanzen entspricht, zeigt jedoch deutlich, daß die Induktion sehr schwach und mit zeitlicher Verzögerung stattfand. Umgekehrt weist der stark reduzierte Blattzuwachs der bei 3 DLT vegetativ gebliebenen Pflanze darauf hin, daß eine suboptimale Induktion erfolgt ist, welche aufgrund der Streubreite in der photoperiodischen Sensitivität unseres Materials jedoch nicht zur vollständigen Umdifferenzierung führte. Damit reagiert unser Pflanzenmaterial noch empfindlicher als für die Elternpflanzen von LANG und MELCHERS (1943) angegeben wurde. Bei ihren Versuchen waren zwei Tage Dauerlicht noch unter dem Schwellenwert. Diese schnelle Reaktion auf induzierende Bedingungen ist eine Voraussetzung für die zeitliche Eingrenzung der Folgeprozesse und spricht für die gute Verwendbarkeit von H.n. bei photoperiodischen Untersuchungen.

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob diese allgemein postulierte qualitative Blühreaktion ("Alles-oder-Nichts-Reaktion") auch erhalten bleibt, wenn die Beleuchtungsstärke reduziert wird. Wirkt also Dauerlicht als Schalter, der beim Erreichen einer bestimmten Gesamtlichtdauer vollständig induziert oder ist die Induktion durch die Lichtintensität quantitativ reguliert. Um dies zu untersuchen, wurden die Versuchspflanzen über den Zeitraum von 2 DLT bis 4 DLT mit Dauerweißlicht von 50 bis 5000 Lux in jeweils abgestuften Schritten belichtet und die Blütrate bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2: Blütrate in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke und der Belichtungsdauer unter Weißlicht.

Bestrahlungsstärke kerg/cm ² sec		0,16	0,32	1,6	6,4	16
Beleuchtungsstärke Lux		50	100	500	2000	5000
Blütrate %	2 DLT	0	0	18	41	50
	3 DLT	0	0	23	83	94
	4 DLT	0	0	36	100	100

Tab.2 zeigt,daß im Bereich von 2 bis 4 DLT die Blütrate quantitativ nicht nur von der Belichtungsdauer,sondern auch von der Beleuchtungsstärke abhängig ist.Beleuchtungsstärken unter 500 Lux haben keinen Einfluß auf die Blütenbildung;oberhalb eines Schwellenwertes,der zwischen 100 und 500 Lux liegt,werden Blüten ausdifferenziert.Nach Überschreiten dieser Schwelle erfolgt eine quantitative Blühantwort,die abhängig ist sowohl von der Energie des eingestrahlten Lichts wie auch von seiner Dauer.Noch anschaulicher ist dieser Befund aus Abbildung 4 zu ersehen.

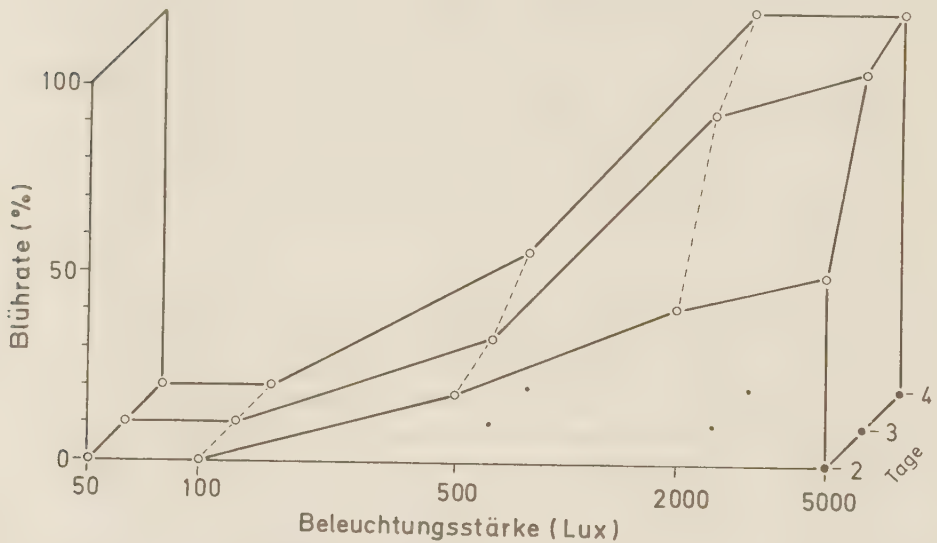


Abb.4:

Blütrate in Abhängigkeit von der Lichtintensität und der Belichtungsdauer unter Weißlicht.

3.1.2. Niederenergiereaktion

Bei genauer Betrachtung der Störlichtversuche,bei denen definitionsgemäß die Niederenergiereaktion (NER) ablaufen soll, zeigen sich zwischen KTP und LTP deutliche Unterschiede im Energiebedarf.Während die Hemmung der Blütenbildung an Soja (KTP) bereits mit 30 kerg/cm^2 vollständig erfolgte,gelang

eine Induktion der Blütenbildung an der LTP Hyoscyamus erst mit 300 kerg/cm^2 und erforderte zur Sättigung der Reaktion sogar 3.000 kerg/cm^2 , wobei die Dauer der Hauptlichtperiode nahe an der kritischen Tageslänge lag (PARKER et al., 1946, 1950; SCHNEIDER et al., 1967). Auch andere Autoren mußten zur Erzielung eines Langtageffektes bei LTP Störlicht geben, dessen Energie weit über der lag, welche für KTP erforderlich war (36.000 kerg/cm^2 bei WASSINK et al., 1958). Da auch KLAUTKE (1972) in orientierenden Versuchen mit Hellrot-Störlicht von 90 min Dauer die Blütenbildung an H.n. nicht induzieren konnte, sollte durch die im folgenden beschriebenen Versuche geklärt werden, welche Bedingungen im eindeutigen Kurztag erforderlich sind, um einen Langtageffekt an H.n. zu erzielen. Im ersten Versuch wurden die Versuchspflanzen für die Dauer von 10 Tagen in der Mitte der 14-stündigen Dunkelperiode hellrotem Störlicht ausgesetzt. Die Bestrahlungsstärke von $8 \text{ kerg/cm}^2 \text{ sec}$, die sich an den zitierten Autoren orientierte, ließ sich durch mehrere Aggregate der beschriebenen Lampen erzeugen. Die Belichtungsdauer von 30 sec bis 64 min war so gewählt, daß die als Produkt von Bestrahlungsstärke und -dauer erhaltene Gesamtenergie einerseits niedrig genug war, um eine Kollision zwischen NER und HER zu vermeiden, wie es KLAUTKE (1972) für das Mißlingen seines Störlichtversuches diskutierte, andererseits aber die Energie auch groß genug war, um eine eventuelle Sättigung der Blühantwort zu erhalten. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tab. 3 dargestellt; wie daraus klar hervorgeht, ist hellrotes Störlicht unter den gewählten Bedingungen erst mit 64 min Belichtungsdauer wirksam, wobei die Bestrahlungsenergie von rund 30.000 kerg/cm^2 gut mit den von STOLWIJK (1955) und WASSINK (1958) ermittelten Werten übereinstimmt. Eine Kollision zwischen NER und HER dürfte damit nicht in Betracht kommen, obwohl es fraglich erscheint, ob dieser hohe Energiebedarf der NER allein zugeschrieben werden kann. Eine Klärung dieser Frage ist durch folgende Überlegung möglich:

Wenn dieses Störlicht über die NER wirkt, dann darf

1. Blau und Dunkelrot nicht wirksam sein und muß
2. der Hellroteffekt durch nachfolgendes Dunkelrot revertierbar sein. Tab. 4 dokumentiert das Ergebnis mehrerer Störlicht-

versuche mit den drei Lichtqualitäten. Die Störlichtgabe erfolgte wie im vorherigen Versuch in der Mitte der Dunkelperiode für die Dauer von 45 min bei einer Versuchslänge über 12 Zyklen. Im Revertierungsversuch wurde das Dunkelrot im unmittelbaren Anschluß an die Hellrot-Vorbelichtung verabreicht.

Tab.4:

Wirksamkeit von Störlicht (45 min) verschiedener spektraler Eigenschaften auf die Blütenbildung und Revertierbarkeit von Hellrot durch nachfolgendes Dunkelrot. Die Bestrahlungsstärken waren für Hellrot ($\lambda_{\max} 660 \text{ nm}$) $10 \text{ kerg/cm}^2 \text{ sec}$, für Blau ($\lambda_{\max} 455 \text{ nm}$) $8,5 \text{ kerg/cm}^2 \text{ sec}$, für Dunkelrot ($\lambda_{\max} 770 \text{ nm}$) $17 \text{ kerg/cm}^2 \text{ sec}$ im Bereich physiologischer Strahlung.

Störlichtfarbe	Blau	Dunkelrot	Hellrot	H'rot+D'rot
Vers.pflanzen	54	54	77	67
vegetativ	54	54	34	48
blühend	0	0	43	19
Blütrate (%)	0	0	56	28

Aus Tab.4 ist ersichtlich, daß lediglich Hellrot die Blütenbildung auslöst. Dies spricht dafür, daß nicht die HER, sondern die NER den Induktionsvorgang vermittelt. Es zeigt sich auch, daß nachfolgendes Dunkelrot die Induktionswirkung vermindert, obschon sie diese nicht völlig aufhebt, wie es zu erwarten wäre. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von DOWNS (1956) und VINCE (1966), die ebenfalls keine vollständige Reversion erzielen konnten. Aus dem Ergebnis kann geschlossen werden, daß auch bei höheren Energiebeträgen die NER abläuft, wobei allerdings auch eine Komponente enthalten sein muß, die keine Hellrot-Dunkelrot-Revertierbarkeit besitzt.

Es stellt sich nunmehr die Frage, weshalb PARKER et al. (1950) nur 6 min Störlicht benötigten, um Blüten im Kurztag zu induzieren, wir dagegen eine 8 bis 10 mal so lange Belichtungsdauer. Bei genauer Betrachtung von PARKER's Veröffentlichung zeigt sich, daß die von ihm verwendete Lichtquelle eine 3 bis 4 mal höhere Energie im wirksamen Spektralbereich lieferte und zum anderen, daß die Hauptlichtperiode mit 12 Stunden Dauer bereits sehr knapp an der kritischen Tageslänge lag.

In orientierenden Versuchen über die Tageslängenabhängigkeit konnten wir sogar zeigen, daß unser Pflanzenmaterial bei einer Tageslänge von 12 Stunden über 8 Zyklen zu fast 20% induziert wurde. Es könnte also bei dieser Dauer der Photoperiode bereits eine suboptimale Induktion erfolgt sein, die durch Störlicht nurmehr quantitativ gefördert wird. Um diese Frage zu klären, wurde hellrotes Störlicht in Verbindung mit täglichen Lichtzeiten von 9 bis 11 Stunden Dauer verabfolgt. Die Versuchsdurchführung entsprach dem vorher beschriebenen Experiment.

Tab.5:

Photoperiodische Reaktion auf Hellrot-Störlicht bei konstanter Bestrahlungsenergie (32.000 kerg/cm^2) in Abhängigkeit von der Dauer der Hauptlichtperiode. Versuchsdauer: 10 Zyklen.

Hauptlichtperiode Std.	9		10		11	
Störlicht min	0	45	0	45	0	45
Vers.pflanzen	16	12	16	12	16	12
vegetativ	16	12	16	3	16	0
blühend	0	0	0	9	0	12
Blütrate (%)	0	0	0	75	0	100

Das Versuchsergebnis (Tab.5) bestätigt die Vermutung, daß der Erfolg einer Störlichtgabe von der Dauer der Hauptlichtperiode abhängig ist; bei einer weiteren Verkürzung der täglichen Lichtphase auf 9 Stunden war auch das in den vorherigen Versuchen wirksame Störlicht für eine Induktion nicht mehr ausreichend. Offenbar werden in der Hauptlichtperiode blühfördernde Prozesse ausgelöst, welche die Induktionsschwelle für eine nächtliche Lichtgabe herabsetzen. Es bleibt allerdings die Frage, ob die Höhe der Schwelle unter Beibehaltung einer qualitativen Alles-oder-Nichts-Reaktion gesenkt wird, oder ob ein quantitativer Übergang zur Blütenbildung hergestellt wird; letzteres würde bedeuten, daß die Blühinduktion das Ergebnis progressiver blühfördernder Prozesse ist. In Tab.5 entspricht die Blütrate zwischen 9 und 10 Stunden Tageslänge einer "Fast-Alles-oder-Nichts"-Reaktion, welche sowohl einen qualitativen, wie auch einen quantitativen Vorgang mit allerdings hoher Steigungsrate andeutet. Um zwischen beiden Alternativprozessen entscheiden zu können, wurden Versuchskombinationen mit einer

graduellen Abstufung der blühfördernden Einzelfaktoren Bestrahlungsstärke und Versuchsdauer zusammengestellt. In der ersten Kombination blieben die Dauer der Hauptlichtperiode und des Störlichts unverändert, dagegen wurden die Bestrahlungsstärken und die Versuchsdauer verschieden kombiniert, woraus sich unterschiedliche Energiesummen ergeben. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen und macht deutlich, daß die Blütrate vom Produkt der Bestrahlungsstärke und der Zahl der repetitiven Zyklen der einzelnen Störlichtgaben abhängt.

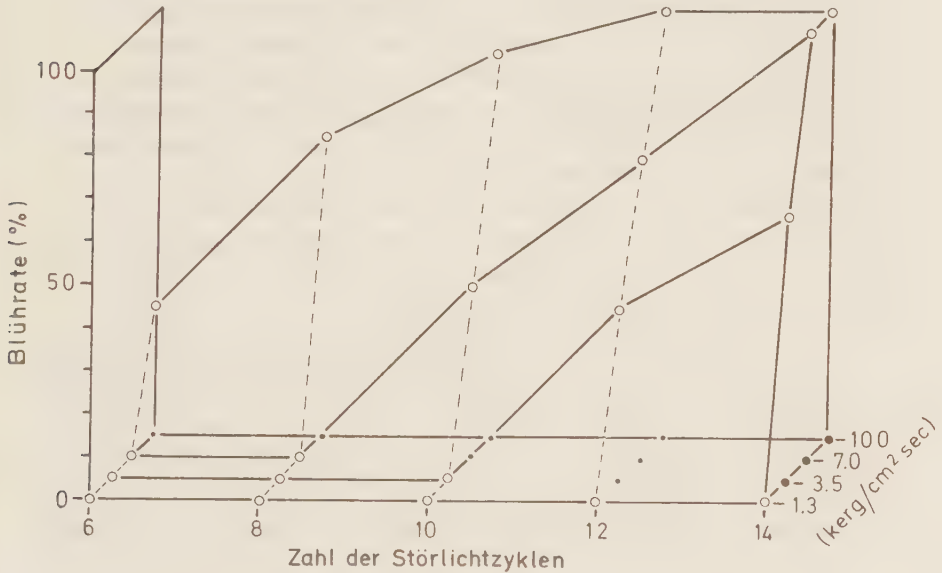


Abb.5:

Abhängigkeit der Blütrate von der Bestrahlungsstärke über mehrere Zyklen. Die Hauptlichtperiode betrug 10 Stunden, das hellrote Störlicht 45 min. Jeder Punkt der Abbildung wurde aus der Blütrate von jeweils 20 Pflanzen ermittelt.

Die Akkumulierbarkeit setzt voraus, daß der durch jedes Störlicht erzielte suboptimale Induktionsstoß bis zur Belichtung am folgenden Tag erhalten bleibt. Dies ist am besten vergleichbar mit einem tagessynchron schwingenden Pendel, das zum Zeitpunkt der Phasenumkehr durch Störlicht einen Anstoß erhält, welcher zu einer Vergrößerung der Amplitude führt.

Während die Amplitude ihrerseits quantitativ die Synthese eines konservativen blühfördernden Prinzips (Blühhormon) steuert, erfolgt der Anstoß durch die Menge an aktivem Phytochrom, welches während der Hellrot-Belichtung gebildet wird. Allerdings ist es nicht einsichtig, weshalb eine derart hohe Energie im Vergleich zu anderen phytochromvermittelten Reaktionen notwendig ist. Wenn lediglich die Menge an totalem aktivem Phytochrom entscheidend ist, dann müßte das photostationäre Gleichgewicht der beiden Zustandsformen in wesentlich kürzerer Zeit eingestellt sein. Falls die Belichtungsdauer von 45 Minuten in keinem Fall unterschritten werden kann, wäre die Phytochromwirkung auf der Basis der "Cycling-Hypothese" zu erklären, derzufolge die über einen bestimmten Zeitraum ablaufende stetige Umwandlung von P_r in P_{fr} in einem gekoppelten Zahnradprozess die physiologischen Antworten auslöst. In einem weiteren Versuch wurde daher die Belichtungsdauer bis auf 5 Minuten verkürzt und zugleich die Versuchsdauer bis auf 24 Zyklen verlängert. Die Blütrate wurde als Mittelwert von 3 Experimenten mit jeweils durchschnittlich 15 Pflanzen errechnet und ist in Abbildung 6 dargestellt;

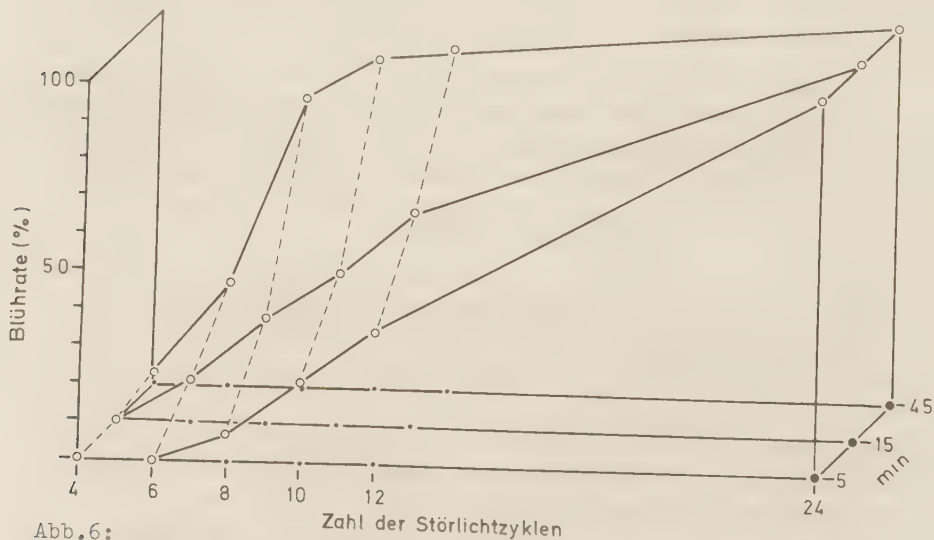


Abb. 6:

Abhängigkeit der Blütrate von der Störlichtdauer über verschiedene Zyklen bei konstanter Bestrahlungsstärke ($10 \text{ kerg/cm}^2 \text{ sec}$). Dauer der Hauptlichtperiode: 10 Stunden.

sie zeigt, daß auch Störlicht bis hinab zu 5 Minuten zu einer vollständigen Induktion führen kann, sofern die Versuchsdauer lange genug gewählt wird. Bei niedrigeren Zyklenzahlen ist die Wirkung jedoch im Vergleich zu länger dauerndem Störlicht deutlich verringert. Um das vorher beschriebene Bild des schwingenden Pendels zu verwenden, führen auch sehr geringe Störlichtimpulse zu einem Aufschaukeln des photoperiodischen Effektes innerhalb eines längeren Versuchszeitraumes. Obwohl auch mit diesem Versuch die primäre Ursache der Störlichtwirkung nicht geklärt ist, so sagt er dennoch aus, daß die durch kurzzeitige Hellrot-Belichtung gebildete Menge an P_{fr} allein nicht zur Blütenbildung führt, sondern daß ein deutlich energieabhängiger Prozeß in den Induktionsvorgang integriert ist, der nicht ohne weiters dem Phytochromsystem zugeordnet werden kann.

3.1.3. Hochenergiereaktion

Die Untersuchung der Anthocyansynthese in Äpfeln führte zu der Entdeckung einer weiteren Photoreaktion (SIEGELMAN und HENDRICKS, 1958), die sich von der NER durch den weit höheren Energiebedarf und ein Wirkungsspektrum mit Maxima im blauen (450 nm) und dunkelroten (720 nm) Spektralbereich unterscheidet. Aus dieser Wellenlängenabhängigkeit wird gefolgert, daß das Phytochromsystem und auch das Photosystem II der Photosynthese beteiligt sind (DOWNS, 1964; HENDRICKS et al., 1965; SCHNEIDER und STIMSON, 1972). Auf den ersten Blick scheint eine Wirkung über das Phytochrom unwahrscheinlich, weil ja das aktive Phytochrom P_{fr} durch Hellrot gebildet und durch das in der HER wirksame Dunkelrot in die physiologisch inaktive Form zurückverwandelt wird. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß bei längerer Belichtung mit Hellrot zwar das photostationäre Gleichgewicht bei $P_{fr}/P_{tot} = 0,8$ eingestellt bleibt, durch Photodestruktion des P_{fr} jedoch die Gesamtmenge an Phytochrom (P_{tot}) abnimmt, wobei die Halbwertszeit mit 45 Minuten angegeben wird (SCHOPFER, 1973). Daraus ergibt sich, daß bei Langzeitbelichtung mit Hellrot die Menge an P_{fr} unter

den Dunkelrotwert abfällt, bei dem das Gleichgewicht $P_{fr}/P_{tot} = 0,03$ ist, wobei jedoch keine Photodestruktion erfolgt. Blaulicht stellt ein Verhältnis von P_{fr}/P_{tot} von 0,4 ein. Durch den geringeren Abbau von Phytochrom verhält es sich dabei wie Dauer-Dunkelrot (CLARKSON und HILLMAN, 1968; KENDRICK, 1972). Obwohl also aufgrund kinetischer Modelle eine Beteiligung des Phytochromsystems auch unter Langzeitbelichtung möglich ist (HARTMANN, 1966; BORTHWICK et al., 1969; SMITH, 1970), ist dieses Ergebnis auf die Induktion der Blütenbildung schon aus dem Grund nicht ohne weiteres übertragbar, weil die Berechnungen auf den Verhältnissen in chlorophyllfreien Geweben basieren. Durch die intensive Interferenz zwischen den verschiedenen, in diesen Spektralbereichen absorbierenden Pigmenten, wie sie in den ausdifferenzierten Pflanzen vorhanden sind, muß mit gänzlich anderen Bedingungen gerechnet werden. Für die primäre Lichtreaktion des Photoperiodismus ist es daher wichtig, nähere Aufschlüsse dafür zu erhalten, welches Pigmentsystem an der HER beteiligt ist und die Folgeprozesse steuert.

In den folgenden Versuchen wurde die Wirksamkeit von Hellrot, Dunkelrot und Blau sowohl als Ergänzung zum natürlichen Kurztag (Zusatzlicht), wie auch als ausschließliche Lichtquelle untersucht. Von der eingestrahlten Gesamtenergie und der Belichtungsdauer her betrachtet, müßte unter diesen Bedingungen die HER ablaufen. In Abbildung 7 ist die Wirkung der drei Lichtfarben als Zusatzlicht zu einem 10-Stunden Tag über einen Zeitraum von 4 bis 12 Versuchstagen dargestellt. Die Blütrate wurde aus mindestens 5 Parallelversuchen mit 160 bis 180 Pflanzen je Lichtfarbe ermittelt. Abbildung 7 zeigt das überraschende Ergebnis, daß nicht nur Dunkelrot und Blau, sondern auch Hellrot einen Langtageffekt erzielt. Zieht man die Wirksamkeit von weißem Dauerlicht als Vergleich heran, so ist allerdings klar zu sehen, daß alle drei Lichtfarben als Zusatzlicht zu einem 10-Stunden Tag deutlich weniger induzieren als weißes Licht. Wie Tab. 1 zu entnehmen ist, lag die Blütrate nach 3 DLT bereits bei ca 100%, wohingegen bei farbigem Licht erst 8 Belichtungstage zu einer vollständigen Induktion führen. Wie läßt sich nun aber die photoperiodische

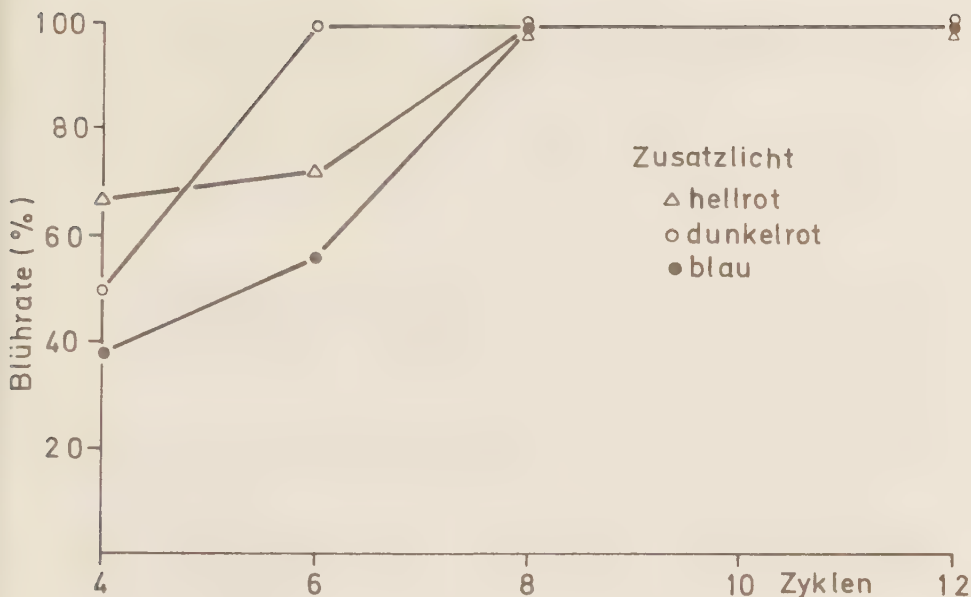


Abb. 7:

Blühinduktion durch verschiedenfarbiges Zusatzlicht (14 Stunden). Die Bestrahlungsstärke der einzelnen Lichtfarben betrug für Hellrot: 7,0 kerg/cm²-sec; Blau: 15,4 kerg/cm²-sec; Dunkelrot: 12,5 kerg/cm²-sec im Bereich physiologischer Strahlung.

Wirksamkeit von Hellrot als 14-stündiges Zusatzlicht erklären? Wie eingangs erwähnt, liegt zu Beginn der Belichtung ein für jede Lichtfarbe unterschiedliches und charakteristisches Verhältnis an P_{fr}/P_{tot} vor. Durch Photodestruktion ist aber nach 4 bis 6 Stunden der Gehalt an P_{fr} für alle Bedingungen gleich niedrig und sinkt im weiteren Verlauf bei Hellrot-Belichtung unter den Schwellenwert (CLARKSON und HILLMAN, 1968). Die in diesem Versuch allerdings anschließende Weißlichtphase führt aber wieder zu einer Phytochromneusynthese, an deren Ende ein photostationäres Gleichgewicht von P_{fr}/P_{tot} von etwa 0,8 steht. Dieser Vorgang wiederholt sich über den Versuchszeitraum hinweg mehrmals. Auf der Basis des Phytochroms wäre die Wirksamkeit von Hellrot daher so erklärbar, daß entweder der nach der 6. Zusatzlichtstunde bei allen drei Lichtfarben gleich niedrige Gehalt an P_{fr} oder aber die

bis dahin erfolgte Abnahme an aktivem Phytochrom über einen gekoppelten cycling-Mechanismus zur Blütenbildung führt.

Wenn die intermittierende Weißlichtphase durch Phytochromneusynthese die Wirkung von Hellrot bedingt, dann dürfte im mehrtägigen Dauerlicht durch Hellrot keine Blüten induziert werden. Soweit aus der Literatur bekannt ist, erfolgt im Dauerhellrot keine Phytochromneusynthese, welche die Photo-destruktion kompensieren könnte. In Abbildung 8 ist das Ergebnis von 4 Dauerlichtversuchen mit denselben Lichtquellen wie vorher, dargestellt. Je Bedingung kamen 90 bis 130 Pflanzen zur Anwendung.

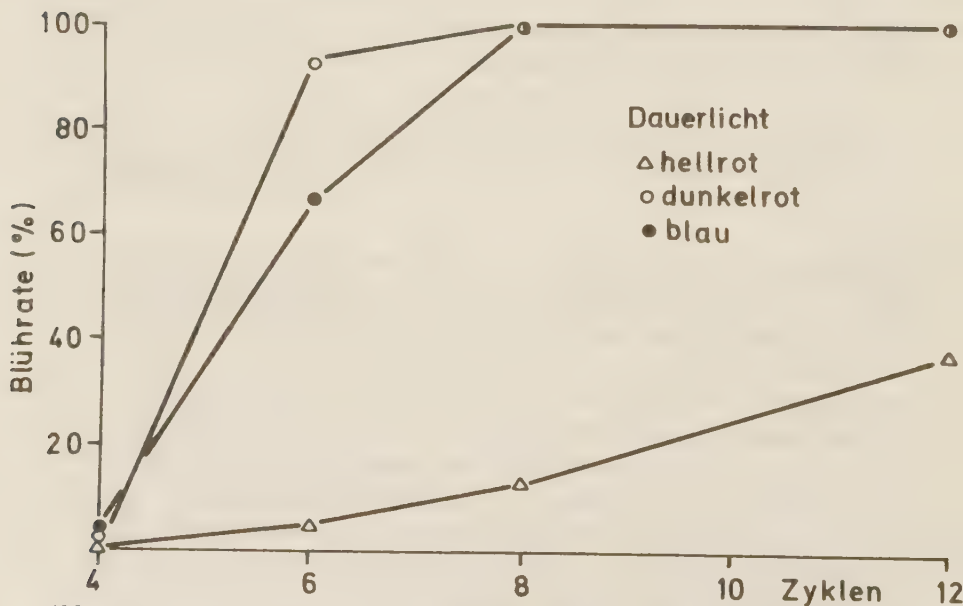


Abb.8:

Blühinduktion durch verschiedenfarbiges Dauerlicht über 4 bis 12 induktive Zyklen. Die Bestrahlungsstärken sind Abb.7 zu entnehmen.

Die Abbildung 8 bestätigt nur teilweise den oben geäußerten Gedanken: Im Dauerlicht ist Dunkelrot und Blau ähnlich wirksam. Nach 8 Versuchstagen wurden wie im Zusatzlicht alle Pflanzen vollständig induziert. Andererseits ruft aber auch Hellrot einen zwar schwachen, aber doch deutlichen Blüherfolg

hervor, der nach 12 Versuchstagen eine Blütrate von 38% erreicht. Der Kurvenverlauf steigt dabei stetig an und erinnert dadurch an die additive Wirkung von Störlicht, wie sie bei der NER gefunden wurde. Es wäre daher denkbar, daß bei dieser Reaktion die Blütenbildung über den gleichen Mechanismus ausgelöst wird.

3.2. Beteiligung der Photosynthese

Eine Vielzahl von Arbeiten unterschiedlicher Zielrichtung tragen zu der Hypothese bei, daß das Photosynthesesystem wenn auch nicht der, so doch ein entscheidender Faktor bei der Induktion der Blütenbildung ist. Erste Veröffentlichungen hierzu berichten, daß sich durch Hemmung der Dunkelatmung oder Infiltration der Blätter mit Zuckerlösung die Blütenbildung unter nichtinduzierenden Tageslängen auslösen läßt (MELCHERS und LANG, 1942; MELCHERS und CLAES, 1943; CLAES, 1947). Dabei scheint allerdings auch eine Wechselwirkung zwischen Photosynthese und Phytochrom zu bestehen. SCHUSTER und KANDELER (1970) zeigten, daß weißes Licht hoher Intensität die phytochrombedingte Hemmung der Blütenbildung aufheben kann. Daß diese Wirkung auf die Photosynthese zurückzuführen ist, wurde dadurch demonstriert, daß DCMU (Dichlorphenyl-dimethyl-Harnstoff), ein Hemmstoff des nichtzyklischen Elektronentransports, diesen Starklichteffekt wieder revertiert. Auch die im Vergleich zu Weißlicht geringere Blühinduktion durch monochromatisches Licht, wie es im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, fügt sich in dieses Bild. Die Frage, welche aus diesem Ergebnis resultiert, ist die, ob die Blütrate in einem direkten Zusammenhang mit der Photosynthese steht. Mit anderen Worten: ist die photosynthetische Assimilatbildung oder auch die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten, wie dies MUMFORD und JENNER (1971) diskutierten, quantitativ an die Blütrate gebunden. Zur Beantwortung dieser Frage wurde mittels radioaktiv markiertem Kohlendioxid die Netto- CO_2 -Fixierung unter den verschiedenen Beleuchtungsstärken untersucht.

3.2.1. Photosyntheserate unter verschiedenen Beleuchtungsstärken.

3.2.1.1. Methode

3.2.1.1.1. Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ an intakten Pflanzen

Bei photosynthetisierenden Pflanzen ist die Markierung mit radioaktivem CO_2 eine einfache und wirtschaftliche Methode, die Rate der Netto- CO_2 -Fixierung bei verschiedenen Lichtqualitäten- und quantitäten zu bestimmen.

Die zur Messung verwendete Pflanze wurde ausgetopft, die Wurzeln von der anhaftenden Erde befreit, und in ein Becherglas mit etwa 50 ml Knopscher Nährlösung gegeben. Mit diesem Gefäß wurde sie in einen Witt'schen Topf gestellt und dieser für wenige Sekunden evakuiert. Sofort anschließend wurde der Topf wieder mit Luft beschickt, die eine von den Versuchsbedingungen abhängige Menge $^{14}\text{CO}_2$ (meist 20 uCi) enthielt, welches durch Einspritzen von $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ (spezifische Aktivität: 54,9 mCi/mM) in 20%ige Perchlorsäure entwickelt wurde. Die Markierungsdauer und die Art und Intensität der Belichtung variiert je nach Versuchsansatz. Am Ende der Fixierungsdauer wurde das Gefäß mit einem vielfachen Volumen Luft gespült. Die dabei ausgetriebene Gefäßluft wurde durch 20%ige KOH geleitet und darin das unverbrauchte $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt. Die so behandelte Pflanze wurde sofort danach gewogen, der Umriß der Blattspreiten zur Ermittlung der Blattfläche abgezeichnet und anschließend in flüssigem Stickstoff oder Trockeneis eingefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurde sie in der Tiefkühltruhe bei -25°C gelagert.

3.2.1.1.2. Extraktion des radioaktiv markierten Materials

Die radioaktiv markierten, tiefgefrorenen Pflanzen wurden mit dem dreifachen ihres Gewichtes an Extraktionspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,8 mit 3% SDS) im Glashomogenisator (Fa. Braun, Melsungen) 3 Minuten bei voller Drehzahl unter Eiskühlung zerrieben. Eine lichtmikroskopische Kontrolle des Extraktes ließ keine intakten Zellen mehr erkennen. Das Homogenat

wurde 2 min im kochenden Wasserbad zur weiteren Extraktion erhitzt und anschließend 30 min bei 100.000 g_{av} zentrifugiert. Das Sediment wurde mit der gleichen Puffermenge resuspendiert, wie vorher zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Diese Extraktionsmethode wurde gewählt, um den Überstand zu der im späteren Abschnitt beschriebenen Untersuchung der Blattproteine weiterverwenden zu können.

3.2.1.1.3. Bestimmung der Radioaktivität

Die Radioaktivitätsbestimmung des Überstandes erfolgte auf verschiedene Weise. Bei hoher spezifischer Aktivität (ca. 10.000 Ipm/ml) wurden 50 ul in einer Scintillationsflüssigkeit (2 Teile Toluol, 1 Teil Triton X 100 mit 0,7% Butyl-PBD) im Scintillationszähler gemessen. Die durch eine leichte Verfärbung des Gemisches bedingte reduzierte Ausbeute ließ sich durch interne Standardisierung mit ¹⁴C-Toluol und ESKV-Ermittlung rechnerisch ausgleichen. Bei geringen spezifischen Aktivitäten (weniger als 100 Ipm/ml) wurde ein Aliquot bei 30°C zur Trockene eingengt. Zur Aufstellung einer Gesamtbilanz wurde die im Fixierungsgefäß verbliebene Radioaktivität aus einem Aliquot der aus 20% KOH bestehenden Absorptionslösung bestimmt. Dazu wurden 100 bis 500 ul auf Filtrierpapier pipettiert und zur Vermeidung eines Isotopenaustausches in ein Verbrennungsgefäß aus Polycarbonat gegeben und verschlossen. Das in den festen Rückständen enthaltene ¹⁴C wurde in einer automatisch arbeitenden Verbrennungsanlage (Oxymat, Fa. Intertechnique) nach der Methode von PETERSON et al. (1969) zu ¹⁴CO₂ oxidiert und in einer Scintillationsflüssigkeit gelöst. Der Gehalt an ¹⁴C ergab sich aus der Impulsrate des Scintillationszählers.

3.2.1.2. Ergebnisse

In Tabelle 6 ist die Rate der Nettofixierung, angegeben als insgesamt extrahiertes ¹⁴C bezogen auf Blattfläche und Fixierungsdauer, dargestellt. Die Tabelle zeigt, daß bereits bei 50 Lux eine gegenüber der Dunkelkontrolle merkliche Netto-Fixierung erfolgt, die mit steigenden Beleuchtungsstärken zunimmt.

Tab.6:
Abhängigkeit der Netto-CO₂-Fixierung von der Intensität des eingestrahnten Lichtes, Einbauzeit: 3 Stunden.

Beleuchtungsstärke (Lux)	0	50	200	500	2000
Einbau im SDS-Gesamtextrakt (I _{pm})	14.750	100.600	479.100	2.915.900	9.587.290
Einbau im festen Rückstand (I _{pm})	680	3.920	15.620	86.730	378.600
Gesamteinbau von ¹⁴ C (I _{pm})	15.430	104.520	494.720	3.002.630	9.965.890
Einbau vom angebotenen ¹⁴ C (%)	0,14	0,95	4,50	27,3	90,6
Blattfläche (cm ²)	110	125,4	115,8	131,3	128,4
NETTO-FIXIERUNG (pc/ cm ² h)	20	126	647	3.465	11.760

Wie den Werten der Einbaurate zu entnehmen ist, war dabei das Angebot an ^{14}C während der dreistündigen Einbauzeit auch bei der höchsten Beleuchtungsstärke noch nicht limitierend. Es ist bemerkenswert, daß 50 Lux nur rund 1% und 200 Lux 5% der Fixierungsrate des für eine vollständige Induktion der Blütenbildung ausreichenden 2000-Lux Wertes erreichen, während es bei 500 Lux bereits 30% sind. Vergleicht man Tab. 2 mit Tab. 6, so zeigt sich, daß auch die Blütrate bei 500 Lux 23% bis 36% der Blütrate bei 2000 Lux beträgt. Schon dieser Befund deutet darauf hin, daß das Photosynthesesystem bei der Blühinduktion im Weißlicht eine Rolle spielt.

3.3. Beteiligung der Photosynthese bei der Blühinduktion durch Farblight.

Nachdem die Versuche mit hellrotem Störlicht auf eine deutliche Energieabhängigkeit der Blühinduktion hingewiesen hatten, lag der Gedanke einer Beteiligung des Photosyntheseprozesses nahe. Ansatzpunkte dafür könnten sich durch den Nachweis einer CO_2 -Abhängigkeit der Störlichtwirkung ergeben. Hierzu wurden 6 Pflanzen in einen Exsikkator gegeben, dieser kurz evakuiert und wieder mit CO_2 -freier Luft gefüllt. Das durch Atmung freigesetzte CO_2 , soweit es überhaupt in den Luftraum des Gefäßes gelangte, wurde mit Zellstoffwatte absorbiert, die mit 20% KOH getränkt war. Obwohl keine Lichtabsorption durch das Exsikkatorglas erfolgte, war es durchaus in Betracht zu ziehen, daß durch Reflexion an der Glasoberfläche die Eigenschaft und Intensität des auf die Pflanzen auftreffenden Lichtes verändert wurde. Um also die Bedingungen für die Versuchspflanzen und die in der normalen Luft verbleibenden Kontrollpflanzen möglichst identisch zu haben, wurden 6 weitere Pflanzen in einen zweiten Exsikkator gegeben, der mit einem langsamen, kontinuierlichen Luftstrom der normalen Zusammensetzung versorgt wurde. Alle Pflanzen wurden dann 45 min lang mit hellrotem Störlicht bestrahlt und anschließend wieder dunkel gehalten. Diese Behandlung wiederholte sich für beide Gruppen über den Zeitraum von 10 Störlichtzyklen, um bei den Kontrollen eine deutliche Blüh-

rate zu erzielen. Das Ergebnis von 4 derartigen Versuchen ist aus Tabelle 7 ersichtlich, und zeigt, daß die Blütrate unter

Tab.7:

Wirkung von 45 Minuten Hellrot-Störlicht in Abhängigkeit vom CO_2 -Gehalt der Luft auf die Blütenbildung von H.n.

	Zahl der Pflanzen			Blütrate
	gesamt	vegetativ	blühend	%
normale Luft	24	2	22	92
CO_2 -freie Luft	24	18	6	25

CO_2 -freien Bedingungen deutlich erniedrigt ist. Dieses Ergebnis ist überraschend, weil der blühinduzierende Effekt von Störlicht der NER des Phytochromsystems zugeschrieben wird. Allerdings zeigt die Tabelle auch, daß die induzierende Wirkung nicht völlig aufgehoben wird, sondern daß eine offenbar CO_2 -unabhängige Komponente (Phytochromsystem?) ebenfalls am Induktionsvorgang beteiligt ist. Trotzdem wäre es vor-schnell, für den CO_2 -abhängigen Teil der Reaktion das Photosynthesesystem verantwortlich zu machen, denn BASSI et al. (1975) veröffentlichten, daß sie eine deutliche CO_2 -Abhängigkeit der Phytochromreaktion fanden. An der KTP Xanthium konnten sie mit nur 4 min Hellrot-Störlicht in der Mitte einer 16-stündigen Dunkelperiode die Blütenbildung hemmen. Gaben sie jedoch während der Störlichtphase CO_2 -freie Luft, so konnten sie die Hemmwirkung des Störlichtes aufheben. Demnach könnte auch die CO_2 -abhängige Komponente dem Phytochrom zugeschrieben werden.

Zweifel an der Beteiligung der Photosynthese ergaben sich auch daraus, daß Blaulicht der gleichen Quantenstromdichte wie Hellrot in den ersten Versuchen als Zusatzlicht weniger, als Dauerlicht gegeben sogar keine Blüten induzierte, sondern vielmehr zu einem raschen Vergilben der Pflanzen führte. Nach 12 Tagen blauem Dauerlicht waren sogar 30% der Versuchspflanzen abgestorben. Die anfängliche Vermutung, die Be-

strahlungsstärke könnte zu hoch sein und eine Blaulichtschädigung des Photosyntheseapparates bewirken (KANDLER und SCHÖTZ, 1956) oder durch eine verstärkte Synthese von Aminosäuren, wie es GRISHINA (1974) fand, den Stoffwechsel beeinträchtigen, wurde dadurch in Zweifel gestellt, daß nach weiterer Erhöhung der Bestrahlungsstärke Blaulicht als Zusatzlicht und Dauerlicht Blütenbildung auslöste (Abb. 7 und 8) und kein Vergilben mehr erfolgte. Daher blieb als mögliche Erklärung, daß das Vergilben der Pflanzen als Mangelercheinung zu betrachten ist, die sich aus einer unzureichenden Netto- CO_2 -Fixierung im Blaulicht ergibt. Betrachtet man allerdings das Wirkungsspektrum der Photosynthese, wie es BALEGH und BIDDULPH (1970) für Bohnen aufgenommen haben, dann ist Blau (437 nm) mit 10,1 Photonen pro reduziertem CO_2 nur geringfügig weniger wirksam als Hellrot (662 nm) mit 8,8 Photonen.

Da die Bedingungen für unsere Versuche von denen der oben zitierten Autoren verschieden waren, wurde die Rate der Nettofixierung von Hellrot und Blaulicht der gleichen Quantenstromdichte durch Fixierung von $^{14}\text{CO}_2$ wie oben beschrieben ermittelt. Die Ergebnisse (Tab. 8) bestätigen, daß Hellrot und Blau gleicher Quantenstromdichte eine unterschiedliche Netto- CO_2 -Fixierung bewirken. Dies erklärt den anfänglichen Mißerfolg von Blaulicht in der HER und macht deutlich, daß eine Blüteninduktion im blauen Licht erst bei einer Bestrahlungsstärke erfolgt, die für eine deutliche Netto-Fixierung ausreicht. Dies ist zwar kein Beweis dafür, daß die Bereitstellung von Photosyntheseprodukten für eine erfolgreiche Induktion notwendig ist, besagt jedoch, daß der Photorezeptor der Blaureaktion und der Photosynthese die gleiche Energieschwelle aufweist.

Tab. 8:

Netto-CO₂-Fixierung in hellrotem und blauem Licht, Fixierungsdauer: 3 Stunden.

Lichtfarbe	Quantenstrom- dichte nE/ cm ² sec	Einbau im Ge- samtextrakt cpm	Einbau im Rückstand cpm	Gesamt- einbau cpm	Einbau vom 14-C Angebot %	Blatt- fläche cm ²	Netto- Fixierung pCi/ cm ² h
Hellrot	2,2	605.000	12.680	617.680	5,6	120,2	1552
Blau	2,2	105.600	1.643	107.243	0,97	141,8	228
Blau	4,5	585.000	12.400	597.400	5,4	149,4	1200
kein Licht	0	13.990	310	14.300	0,13	134,3	32

4. Untersuchungen über die chemische Natur des Blühhormons

4.1. Wirkung von Salicylsäure, Aspirin und Phytohormonen bei Infiltration in die Blätter.

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, sind in den letzten Jahren verschiedenen Substanzen "Blüh hormoneigenschaften" zugeschrieben worden; neben der Salicylsäure und Aspirin waren dies vor allem auch die bereits bekannten Phytohormone. Die Vermutung, daß diese Stoffe der Blühstimulus selbst oder Bestandteil eines "Blüh hormonekomplexes" sind, basiert auf Befunden über ihre blühinduzierende Wirkung bei Applikation auf die ganze Pflanze oder den Vegetationspunkt; diese Art der Applikation könnte aber über einen unspezifischen Einfluß auf das Apikalmeristem eine spezifische Beteiligung am Blühstimulus nur vortäuschen. Nachdem das "Blüh hormone" eindeutig im Blatt gebildet wird, sollte geprüft werden, ob Salicylsäure, Aspirin und Phytohormone auch bei einer selektiven Zufuhr in die Blätter eine Wirkung auf die Induktion der Blütenbildung zeigen. Dabei dürfte die verwendete Infiltrationstechnik folgende Vorzüge haben:

1. In den vergleichbaren Versuchen (LANG, 1957; CLELAND und ZEEVART, 1970) wurden die Substanzen an mindestens 10 hintereinander folgenden Tagen jeweils einmal auf den Vegetationspunkt aufgetragen oder bis zu 25 Tagen auf die Blätter aufgesprüht (LIVERMAN und LANG, 1956). Da der Vorgang der Blühinduktion bei H.n. unter optimalen Bedingungen

- aber bereits nach 48 bis 72 Stunden abgeschlossen ist (KLAUTKE und RAU, 1974), ist diese Behandlungsdauer für eine zeitliche Eingrenzung der Folgeprozesse nachteilig.
2. Bei der mittels Infiltration möglichen selektiven Blattbehandlung gelangt die infiltrierte Substanz über das bestehende Transportsystem zum Vegetationspunkt, was den natürlichen Bedingungen am nächsten kommt.
 3. Durch Infiltration gelangt ein weit größeres Lösungsvolumen in die Pflanze als beim bloßen Auftragen; dadurch können bei gleicher Substanzmenge geringere Konzentrationen verwendet werden.

4.1.1. Methode

Für die Versuche wurden gleichmäßig gut entwickelte Pflanzen, die im Durchschnitt 2 1/2 Monate alt waren, bis auf 4 Blätter und den Vegetationspunkt mit ca. 15 Primordien abpräpariert. Die anschließende Infiltration erfolgte nach der Methode von LANG und MELCHERS (1943). Dazu wurden die Pflanzen auf einer Lochplatte umgekehrt in einen Exsikkator gehängt, so daß nur die Blätter in die zu infiltrierende Lösung eintauchten. Eine zweimalige Infiltration von jeweils 20 min der auf etwa 25°C erwärmten Lösung war bei guter Beleuchtung ausreichend, um die gesamten Interzellularen mit der Lösung zu füllen. Die Blätter waren dann vollständig infiltriert, wenn sie auf der ganzen Fläche dunkelgrün und glasig durchscheinend waren. Nach der Infiltration wurden die Pflanzen umgekehrt in destilliertes Wasser getaucht, um die auf den Blättern verbliebene Lösung abzuspülen und eine Benetzung des freigelegten Vegetationspunktes mit der Infiltrationslösung zu vermeiden. Anschließend wurden die Pflanzen in einen schwachen, warmen Luftstrom gestellt, um das Wasser vollständig aus den Interzellularen zu verdunsten. Zur Erhaltung der Turgeszenz erwies sich ein öfteres leichtes Besprühen der Blätter mit Wasser als vorteilhaft.

Durch entsprechende Kontrollen konnte gezeigt werden, daß Präparation und Infiltration die photoperiodische Sensitivität nicht beeinträchtigen. Zur völligen Absicherung wurden

jeweils Kontrollen mitgeführt, die in gleicher Weise behandelt, aber nur mit dest. Wasser oder dem entsprechenden substanzfreien Lösungsmittel infiltriert waren.

Für die Infiltration wurden die Versuchspflanzen einen Tag zuvor in der beschriebenen Weise präpariert. Gibberellin A₃ (Gibberellinsäure, Bezugsquelle MERCK) wurde zunächst in 50 ml 80%igem Äthanol gelöst und dann auf die entsprechenden Endkonzentrationen von 0,2 µg/ml bis 100 µg/ml (jeweils in 5 l Lösung) verdünnt. Auxin (3-Indoleessigsäure, Bezugsquelle MERCK) wurde in den Konzentrationen 3 bis 24 µg/ml, Kinetin (6-Furfuryl-aminopurin, Bezugsquelle MERCK) in den Konzentrationen 0,8 µg/ml bis 16 µg/ml in Lösung gebracht.

In Vorversuchen wurde das von den Blättern aufgenommene Lösungsvolumen ermittelt; es ist abhängig von der Blattfläche, der Blattstärke und dem Blattalter. Bei den hier geschilderten Versuchen betrug die je Pflanze aufgenommene Lösungsmenge bei einer Blattfläche von insgesamt $160 \pm 10 \text{ cm}^2$ durchschnittlich 2 ml. Allerdings läßt sich hieraus nicht ableiten, wie groß die tatsächlich in die Zelle aufgenommene Substanzmenge ist, da nach dem Austrocknen der Interzellularen ohne Kenntnis des Aufnahmevorganges davon ausgegangen werden muß, daß ein Teil an den angrenzenden Zellwänden verbleibt.

4.1.2. Infiltration von Salicylsäure und Aspirin

Auf der Suche nach der stofflichen Natur des Blühhormons veröffentlichte CLELAND (1974), daß er im Phloemexsudat blühender und vegetativer Xanthiumpflanzen Salicylsäure nachweisen konnte, die in der Konzentration von 5,6 µM allerdings nur bei *Lemna gibba* Blüten induzierte. Er folgerte daraus, daß Salicylsäure bei der Blüteninduktion beteiligt ist. PIETERSE und MÜLLER (1977), die dieses Ergebnis an *Lemna* bestätigten, führen die Wirkung von Salicylsäure und verwandter Verbindungen auf eine Chelatbindung bestimmter Metallionen zurück.

In gleicher Weise konnten BHALLA und SABHARWAL (1975) durch Zugabe von 2,5 ppm Aspirin zur Nährlösung von *Lemna* bei 33%

der Pflanzen Blüten induzieren. Dieser Befund deutet insofern in die gleiche Richtung, als Aspirin (Acetylsalicylsäure) aufgrund der engen chemischen Verwandtschaft mit Salicylsäure über den gleichen Reaktionsweg auf die Blütenbildung Einfluß nehmen könnte. Den Autoren zufolge soll Aspirin durch Bindung von Kupfer im Zellinneren die Blütenbildung regulieren. Daneben haben die Salicylate vielfältige Wirkungen auf den Stoffwechsel gezeigt, wie z.B. die Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung und verschiedene Effekte auf den Kohlenhydrat-, Nitrat- und Fettmetabolismus (Lit. siehe bei PIETERSE und MÜLLER, 1977).

Diese Berichte ließen es angebracht erscheinen, die Wirkung von Salicylsäure und Aspirin auf die Blütenbildung von H.n. zu untersuchen. Die Applikation von Salicylsäure erfolgte in den Konzentrationen von 2,8 μ M, 5,6 μ M und 11,2 μ M (in dest. Wasser gelöst) entsprechend 0,387 mg/l, 0,774 mg/l und 1,548 mg/l Infiltrationslösung. Aspirin (Bezugsquelle SIGMA) wurde in den bei Lemna wirksamen Konzentrationen 1,25 ppm, 2,5 ppm und 5,0 ppm entsprechend 1,25 mg/l, 2,5 mg/l und 5,0 mg/l in gleicher Weise in die Blätter von H.n. infiltriert.

Die Auswertung der mit Salicylsäure oder Aspirin infiltrierten Versuchspflanzen nach 6 Wochen Nachreaktionszeit zeigte gegenüber den wasserinfiltrierten Kontrollen keinen Unterschied (Tab.9). Keine der 54 Pflanzen hatte Blütenanlagen aufzuweisen oder einen reduzierten Blattzuwachs, der als Indiz für eine unterschwellige Induktion gelten könnte. Zumindest in dem verwendeten Konzentrationsbereich haben Salicylsäure und Aspirin keinen blühfördernden Einfluß auf *Hyoscyamus niger*.

4.1.3. Infiltration von Phytohormonen

Phytohormone sind aufgrund ihrer wenig spezifischen Wirkung auf Wachstums- und Entwicklungsvorgänge (Lit. und Zusammenfassung siehe KANDELER, 1974) in noch unbekannter Weise fördernd oder hemmend an der Blütenbildung beteiligt. Während die blühfördernde Wirkung der Gibberelline an mindestens 23 Arten

Tab.9:

Die Wirkung von Salicylsäure und Aspirin auf die Blütenbildung nach Infiltration in die Blätter von *Hyoscyamus niger*

Salicylsäure				Aspirin			
Konz.	Versuchspflanzen			Konz.	Versuchspflanzen		
mg/l	gesamt	blüh.	Blattzuwachs	mg/l	gesamt	blüh.	Blattzuwachs
o	8	o	34,3 $\pm$ 2,4	o	8	o	37,4 $\pm$ 2,1
o,367	18	o	33,5 $\pm$ 2,5	1,25	18	o	40,2 $\pm$ 2,5
o,774	16	o	31,3 $\pm$ 1,3	2,5	16	o	34,6 $\pm$ 2,8
1,548	18	o	32,0 $\pm$ 1,6	5,0	18	o	35,2 $\pm$ 1,6

von LTP gezeigt werden konnte (Zusammenfassung LANG, 1965), beschränken sich die Berichte über Blüteninduktion durch Auxine und Kinetin auf wenige Pflanzen. Eine blühfördernde Wirkung von Auxin wurde für *Lolium temulentum* (EVANS, 1964) sowie *Silene* und *Hyoscyamus* (LIVERMAN und LANG, 1956) beschrieben. Letztere Autoren bemerken jedoch dazu: "Our results show that induction by applied auxin becomes apparent only under the very specific conditions wherein auxin has been made the limiting factor." Noch spärlicher sind die Hinweise auf eine blühfördernde Wirkung von Kinetin an LTP (MICHNIEWICZ und KAMIENSKA, 1965). Neueren Ergebnissen zufolge soll es aber bei Senfpflanzen Bestandteil eines "multicomponent floral stimulus" (BERNIER, 1976) sein, wobei die einzelnen Komponenten je nach Pflanzenart verschieden sind.

KOPCEWICZ und PORAZINSKY (1974) konnten die blühinduzierende Wirkung einer aus blühenden Salviapflanzen isolierten Östrogenfraktion bei Zusatz von Kinetin und Gibberellin deutlich steigern. Ein Azetonextrakt blühender Xanthiumpflanzen benötigte ergänzend Gibberellin, um vegetative Pflanzen zu induzieren (HODSON und HAMNER, 1970). Da allerdings der Extrakt vegetativer Pflanzen auch mit Zusatz von Gibberellin nicht induzierte, folgerten die Autoren, daß Gibberellin eine weitere Komponente des Extraktes (das Blühormon) zur Induktion benötigt. Bei LTP dagegen, die im Kurztag eine Rosette bilden,

bewirkt Gibberellin sowohl die Blütenbildung wie auch die sonst nur im Langtag oder Dauerlicht erfolgende Sproßstreckung ("Schossen"). Die Folgerung von BÜNSOW und HARDER (1956), daß Gibberellin den Langtag ersetzt, muß insoweit eingeschränkt werden, als Blütenbildung und Schossen normalerweise simultan erfolgen. Es läßt sich daher bislang nicht eindeutig sagen, ob beide Vorgänge über jeweils verschiedene Reaktionswege laufen oder sich gegenseitig beeinflussen. In Tabelle 10 ist die Wirkung der einzelnen Phytohormone auf die Blütenbildung nach einmaliger Blatinfiltration im 10-Stunden Kurztag dargestellt; wie die Ergebnisse zeigen, läßt sich lediglich mit Gibberellin Blütenbildung bei bis zu 51% der Pflanzen im Kurztag erzielen. Dies bestätigt die oben zitierten Befunde, wonach Kinetin und Auxin nur unter ganz besonderen Bedingungen die Blütenbildung fördern.

Neben der Induktion der Blütenbildung erfolgt nach Gibberellin-infiltration auch eine von der Konzentration abhängige Streckung der Sproßachse. Nach LANG (1957) entfaltet Gibberellin seine blühfördernde Wirkung sekundär über die Induktion der Sproßstreckung. Um dies zu überprüfen, wurde die Länge der Sproßachse von der Oberkante der deutlich ausgebildeten Rübe bis zum Vegetationspunkt ausgemessen und der Mittelwert aller Messungen mit der jeweiligen Standardabweichung (σ) berechnet. In Abbildung 9 sind die morphogenetischen Veränderungen in Abhängigkeit von der infiltrierten Gibberellinmenge dargestellt; daraus ist ersichtlich, daß Gibberellin ab einer bestimmten Konzentration die Ausbildung von Blüten und die Sproßstreckung induziert und die Verlängerung der Sproßachse konzentrationsabhängig fördert. Dabei zeigt der Kurvenverlauf für beide Induktionsvorgänge zum einen, daß der Schwellenwert für die Blühinduktion mit 0,4 ug deutlich niedriger liegt als für die Sproßinduktion mit 2-8 ug je Pflanze. Demzufolge erscheint es unwahrscheinlich, daß die durch Gibberellin ausgelöste Blütenbildung sekundär durch die Sproßstreckung induziert wird, wie dies LANG (1957) diskutierte. Vielmehr könnte man schließen, daß lediglich die zu 100% erfolgende und direkt quantitativ geförderte Sproßstreckung durch Gibbe-

rellin vermittelt wird. Dagegen wird die Blüteninduktion auch bei der höchsten Gibberellinkonzentration nur bis zu ca 50% ausgelöst. Auch CLELAND und ZEEVART (1970), die Gibberellin auf den Vegetationspunkt von *Silene* auftrugen, konnten die Sproßstreckung konzentrationsabhängig fördern, ohne gleichzeitig die Blütenbildung vollständig zu induzieren.

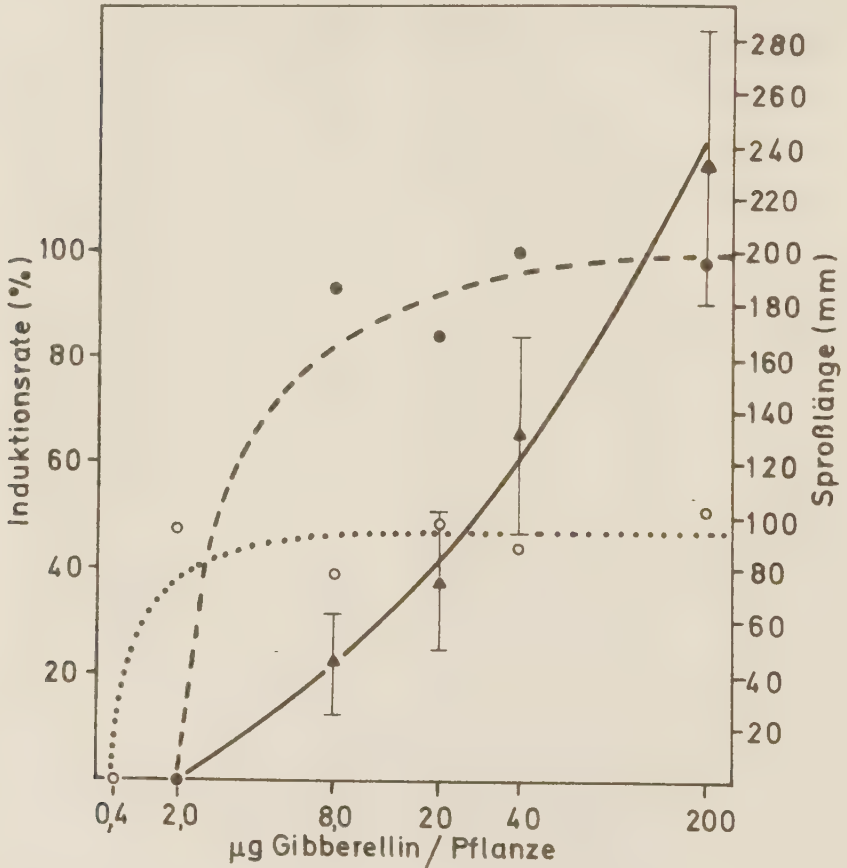


Abb. 9:

Wirkung einmaliger Gibberellininfiltration auf die Induktion der Blütenbildung und Sproßstreckung in Abhängigkeit von der Konzentration. Induktionsrate der Blütenbildung (.....), der Sproßstreckung (---). Durchgezogene Linie (—) Verlängerung der Sproßachse.

Wie aber läßt es sich erklären, daß die Blütenbildung trotz der sehr niedrigen Schwelle unabhängig von der Gibberellinmenge nur teilweise, und das mit einer erstaunlich geringen Abweichung, induziert wird? Aufgrund des Alles-oder-Nichts-Charakters einer Induktion wäre zu erwarten, daß entweder alle Pflanzen Blüten ausbilden oder keine. Das Ergebnis läßt sich so interpretieren, daß am Vegetationspunkt gerade soviel Blühstimulus vorhanden ist, daß die zur Differenzierung von Blütenanlagen erforderliche Minimalmenge gerade erreicht wird, um etwa jede zweite Pflanze zu induzieren. Dieser Stimulus kann nicht das applizierte Gibberellin sein, weil dieses, wie die Sproßlänge zeigt, in linearem Verhältnis mit der vom Blatt aufgenommenen Menge am Vegetationspunkt vorhanden ist. Daraus ist zu folgern, daß die Wirkung von Gibberellin bezüglich der Blühinduktion bereits im Blatt erfolgt, und zwar in der Weise, daß die Synthese eines Blühstimulus ausgelöst oder gefördert wird. Dem widerspricht es nicht, daß auch nach Behandlung des Vegetationspunktes Blütenanlagen ausgebildet werden. Da der Transport von Gibberellin im Xylem und Phloem erfolgt (CHAILAKHYAN und KHLOPENKOVA, 1973), ist es durchaus möglich, daß auf den Vegetationspunkt aufgetragenes Gibberellin durch den Transpirationsstrom in die Blätter gelangt und dort die blühinduzierende Wirkung entfaltet. Dies stünde im Einklang mit der oben zitierten zeitlichen Verzögerung von Blüteninduktion und Sproßstreckung (LANG, 1957) oder der unvollständigen Blüteninduktion nach Gibberellinbehandlung des Vegetationspunktes von *Silene* (CLELAND und ZEEVART, 1970). Eine Schwierigkeit, die Gibberellinwirkung vollständig zu erklären, ergibt sich jedoch daraus, daß auch bei der höchsten Gibberellinkonzentration im Blatt nur eine suboptimale Blüteninduktion erfolgt. Es wäre doch vielmehr anzunehmen, daß bei der 500-fachen Menge an Gibberellin auch mehr Stimulus synthetisiert wird. Zwei Erklärungen kommen in Betracht:

1. Gibberellin ist nicht der "richtige" Effektor für die Synthese oder
2. der Blühstimulus ist im Blatt in ausreichender Menge vorhanden, aber der Transport zum Vegetationspunkt ist nahezu blockiert.

5. Einfluß blühinduzierender Bedingungen auf das Proteinmuster im Blatt.

Nimmt man bei der Induktion der Blütenbildung das Konzept an, daß die Umsteuerung des Vegetationspunktes vom Abruf der Information zur Ausbildung von Blüten begleitet ist, so ist ausgehend von einer Genderepression über den Weg der Transskription und Translation eine de-novo Synthese von m-RNS und von Enzymen zu erwarten. Diese Hypothese wird für die Blütenbildung nur durch wenige Befunde unterstützt; so fanden z.B. CHERRY und VAN HUUSTEE (1965), daß in den induzierten Vegetationspunkten von *Xanthium* relativ mehr Nukleinsäuren synthetisiert werden als in vegetativen. Nach neuen Untersuchungen an *Lemna* (TOBIN und KLEIN, 1975) weisen Pflanzen aus verschiedenen Lichtbedingungen quantitative und qualitative Unterschiede der poly-A enthaltenen RNS auf; anhand ihrer Matrizeneigenschaft in einem zellfreien Weizenkeimlingsystem wurde die RNS-Fraktion als m-RNS charakterisiert. Völlig ungeklärt ist dagegen noch, ob auch bei der Induktion der "Blühormon-Synthese" im Blatt das Nukleinsäuresystem und eine Neusynthese von Proteinen eine Rolle spielt (Lit. und Diskussion siehe EVANS, 1971).

Wie bereits in der Einleitung besprochen wurde, existieren über Veränderungen des Proteinmusters im Blatt im Zusammenhang mit der Induktion der Blütenbildung nur wenige widersprüchliche Angaben; nachdem aber KLAUTKE (1971) bei

Hyoscyamus gewisse Anhaltspunkte gefunden hatte, sollte mit Hilfe neuer Methoden versucht werden, entsprechende Veränderungen nachzuweisen.

5.1. Auftrennung der Blattproteine durch Gelfiltration

In Anlehnung an die Versuche von KLAUTKE (1971) wurde zunächst die Methode der Proteinfraktionierung mittels Gelfiltration an Sephadex in leicht veränderter Form übernommen. Bei radioaktiver Markierung der Proteine im Zusammenhang mit der Blühinduktion sollten neu synthetisierte Enzyme durch Vergleich des Elutions- und Einbauprofils der löslichen Proteine aus vegetativen und induzierten Blättern aufzufinden sein.

5.1.1. Material und Methode

5.1.1.1. Radioaktive Markierung der Pflanzen mit ^{14}C -Leucin

Zur radioaktiven Markierung wurde nach Durchführung des Belichtungsprogrammes ein an der Pflanze verbleibendes Blatt an der Mittelrippe leicht gefaltet und in eine Küvette (Höhe 13cm, Breite 4,3cm, Dicke 0,5cm) eingeführt, in der sich 25 ml L-Leucin- ^{14}C -U (2uCi/ml) befand. Pflanze und Küvette wurden in einen Exsikkator gegeben und die Infiltration in der beschriebenen Weise durchgeführt. Das vom Blatt aufgenommene Lösungsvolumen betrug bei einer Blattfläche von 40 cm² ca. 0,5 ml entsprechend 1 uCi ^{14}C -Leucin. Nach einer Einbauzeit von 6 Stunden wurde das Blatt abgeschnitten und bis zur Weiterverarbeitung in Trockeneis eingefroren und bei -25°C gelagert.

5.1.1.2. Extraktion der leichtlöslichen Proteine

Für die nachfolgende Auftrennung über Sephadex wurden die wasserlöslichen Proteine von Blättern induzierter Pflanzen (3 Tage Dauerlicht oder Infiltration mit CHI) und nichtinduzierter Pflanzen (10-Stunden Kurztag) unmittelbar nach der

blühinduzierenden Behandlung und radioaktiven Markierung mit dem 2-fachen Gewicht Puffer, bestehend aus 0,1 M Tris-HCl, p_H 8,0 mit 0,5 M Saccharose, 0,1% Ascorbinsäure und 5×10^{-3} M Mercaptoäthanol mittels eines Glashomogenisators 5 min bei 1200 U/min unter Eiskühlung zerrieben. Der Zusatz von Ascorbinsäure erwies sich als vorteilhaft, weil Ascorbinsäure als bestes Quinon reduzierendes Agens beschrieben wird (VAN LOON und VAN KAMMEN, 1968). In Verbindung mit dem leicht alkalischen p_H -Wert des Puffers, bei dem die Phenole dissoziieren und dadurch keine Wasserstoffbrücken mit den Proteinen bilden können, ließ sich das rasche Braunwerden der Extrakte verhindern. Anschließend wurde das Homogenat 30 min bei 70.000 xg_{av} und weitere 60 min bei 120.000 xg_{av} bei 2 bis 4°C zentrifugiert. Der hellgrüne Überstand wurde in einem Visking-Dialysierschlauch über Nacht gegen denselben Puffer (ohne Saccharose) dialysiert und anschließend gegen trockenes Dextran T 70 (ROTH) auf 1 bis 2 ml (entsprechend ca. 50 mg Protein/ml) eingeengt. Der so erhaltene Rohextrakt wurde anschließend durch Gelfiltration fraktioniert.

5.1.1.3. Gelfiltration über Sephadex G 200

Zur Fraktionierung der löslichen Proteine wurden in 3 l Puffer (10^{-2} M Tris-HCl, p_H 7,5 mit 0,1 M KCl und 5×10^{-3} M Mercaptoäthanol) 25 g Sephadex G 200 für 4 Tage gequollen und in ein Chromatographierohr (80x2,5 mm) bis zu einer Gelhöhe von 700 mm gefüllt. 1-2 ml des Proteinrohextraktes wurden durch vorsichtiges Unterschichten der über dem Gel stehenden Pufferlösung auf den auf der Säulenfüllung liegenden Siebkorb aufgetragen und mit Elutionspuffer mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 2 Tropfen/min eluiert. Die Eichung der Säule nach Molekulargewicht erfolgte mit Chymotrypsinogen (MG 25.000 Dalt), Aldolase (MG 147.000 Dalt), Katalase (MG 240.000 Dalt), Ferritin (MG 740.000 Dalt) und Dextranblau (MG 1.000.000 Dalt). Zur Bestimmung der Proteinmenge im Eluat wurde die Transmission der einzelnen Fraktionen bei 280 nm gemessen und zur Überprüfung der Reinheit das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm

und 280 nm bestimmt (Lit. BAILEY, 1962). Die Gesamtradioaktivität in den Fraktionen wurde durch Scintillationsmessung eines Aliquots bestimmt. Um den Anteil der Radioaktivität zu erfassen, der tatsächlich im Protein eingebaut ist, wurden die Fraktionen mit Rinderserumalbumin als Carrier versetzt (1,25 mg/5ml) und das Protein mit 60% TCA (10% Endkonzentration) über Nacht bei 2 bis 4 ° C ausgefällt. Der Niederschlag wurde anschließend über Glasfibrerfilter GF/C (Whatman) gesaugt, dreimal mit 10% TCA (eisküht) nachgewaschen und mit 5 ml 90% Äthanol (-20 ° C) getrocknet. Nach vollständiger Austrocknung wurde die Radioaktivität auf den Plättchen im Scintillationszähler gemessen.

5.1.2. Ergebnisse

Abbildung 10 zeigt die Elutions- und ^{14}C -Einbauprofile der Rohextrakte von induzierten und nichtinduzierten Blättern nach Auftrennung über Sephadex G 200. Daraus ist deutlich zu erkennen, daß die Profile der nichtinduzierten Kurztag-Kontrolle mit denen nach Induktion mit Dauerlicht oder CHI-Infiltration im wesentlichen identisch sind. Übereinstimmend mit dem Elutionsprofil, das RICHTER et al., (1975) nach Fraktionierung von Proteinen aus Gerstenblättern über Sephadex G 200 erhielten, wird das meiste Protein im Bereich der Fraktionen 15 bis 25 eluiert. Bei diesem hochmolekularen Protein dürfte es sich nach den Befunden von KAWASHIMA und WILDMANN (1970) um das Fraktion-I-Protein handeln, das nach BLAIR und ELLIS (1973) Ribulose-1,5-Diphosphatcarboxylase-Aktivität besitzt und 50 bis 60 % des leichtlöslichen Proteins von Blättern grüner Pflanzen ausmacht. Da im Zusammenhang mit der Blühinduktion jedoch nur ein kleiner Teil des Gesamtproteins verändert sein dürfte, ist es sehr unwahrscheinlich, daß es in diesem Bereich aufzufinden ist. Vielmehr dürften die unter induzierenden Bedingungen eventuell neuentstehenden Proteine niedrigere Molekulargewichte aufweisen, also im Bereich der Fraktionen 25 bis 55

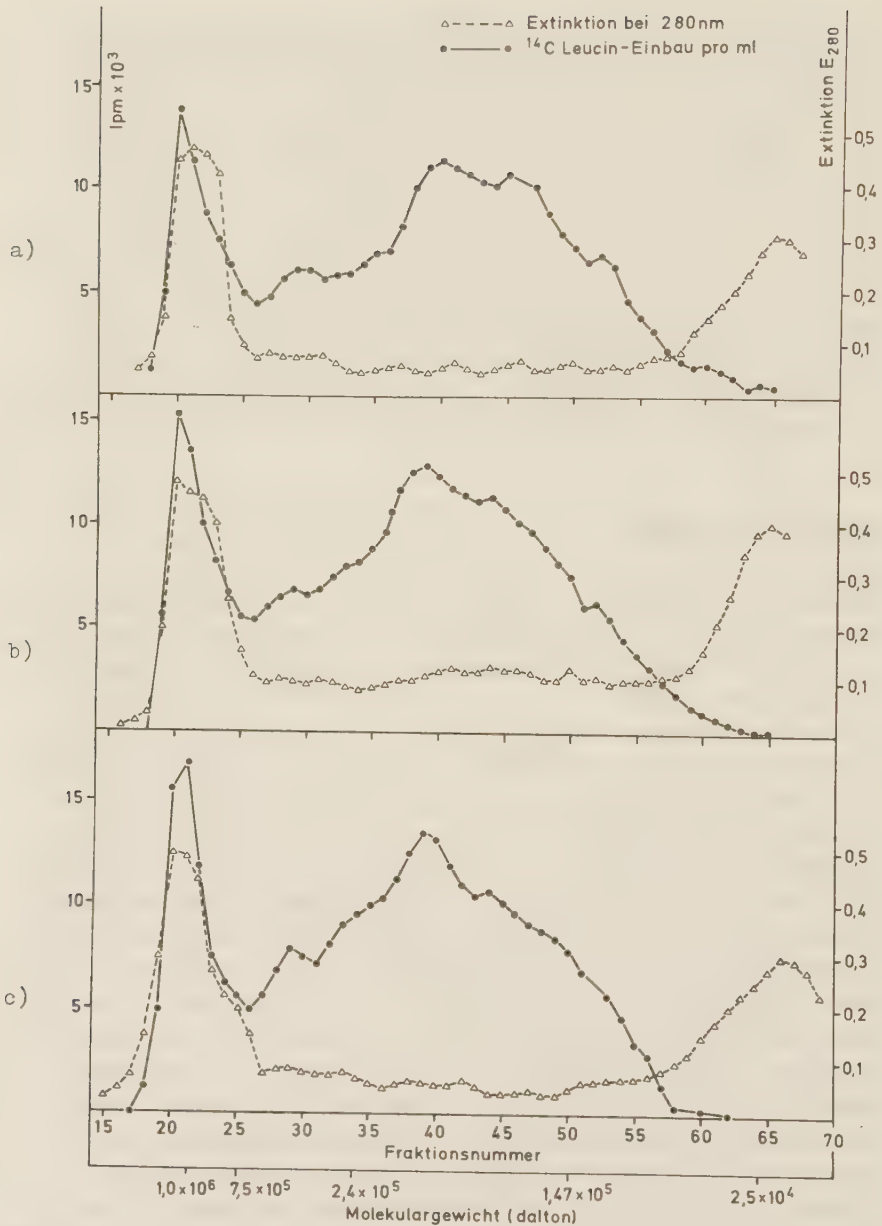


Abb. 10:

Elutions- und ^{14}C -Einbauprofile der Rohextrakte von a) nicht induzierten (Kurztag), b) mit 3 Tagen Dauerlicht induzierten und c) mit CHI induzierten Pflanzen.

erscheinen. Betrachtet man diesen Bereich, so fällt auf, daß einer relativ geringen Proteinmenge ein relativ hoher Einbau entspricht. Das bedeutet, daß die wenigen eluierten Proteine in besonderem Maß während der Markierungsdauer synthetisiert worden sind. Allerdings gestattet weder das Muster der Proteinverteilung, noch das charakteristische Einbauprofil eine Aussage darüber, ob nach Induktion der Blütenbildung eine Neusynthese von Proteinen erfolgt. Immerhin ist es aber für die Frage der CHI-Wirkung bemerkenswert, daß nach Behandlung der Pflanzen mit dem als Hemmstoff der Proteinneusynthese beschriebenen CHI der Einbau von Leucin in die Proteine bei der verwendeten Konzentration keineswegs gehemmt wird. Nicht nur im Bereich des Fraktion-I-Proteins, das vorwiegend an 70 S- Ribosomen synthetisiert wird, sondern auch im ganzen übrigen Proteimbereich entspricht der Einbau den unbehandelten Kontrollen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Einbaukinetik für ^{14}C -Leucin und $^{14}\text{CO}_2$ überein, derzufolge nach Infiltration mit CHI und Einwirkung über 72 Stunden die Einbaurrate mehr als 90 % der wasserinfiltrierten Kontrollpflanzen betrug (Abb. 18).

Aus den Ergebnissen der Gelfiltration ist entweder die Folgerung zu ziehen, daß nach Induktion der Blütenbildung keine Enzyme neu synthetisiert werden, welche die Produktion des Blühstimulus einleiten, oder man gelangt zu dem Schluß, daß diese Enzyme zwar neu gebildet, aber aufgrund ihrer geringen Menge von den übrigen Proteinen "überdeckt" werden. Letztere Annahme ist sehr wahrscheinlich, weil die Gelfiltration in der verwendeten Weise lediglich eine grobe Vorreinigung, aber keinesfalls eine differenzierte Fraktionierung des Rohextraktes gestattet. Bevor daher eine Enzymneubildung ausgeschlossen werden kann, sollte mittels anderer Methoden eine bessere Auftrennung der Proteine versucht werden.

5.2. Auftrennung der Blattproteine mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Es ist zwar denkbar, daß sich durch eine Vorreinigung des Rohextraktes mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung und Verwendung von Sephadexgelen verschiedener Porengrößen die Trennschärfe der Gelfiltration erhöhen läßt, doch erschien die weitere Verwendung unzweckmäßig. Ein wesentlicher Grund dafür bestand darin, daß nur jeweils der Extrakt einer Bedingung ohne die zugeordnete Kontrolle aufgetrennt werden konnte; da sich das Gelbett auch bei geringer Durchflußrate verändert, wäre ein direkter Vergleich der Elutionsprofile nur bedingt möglich.

Für die weitere Fraktionierung der Proteine bot sich die Polyacrylamidgel-Elektrophorese an. Ihre besonderen Vorteile bestehen darin, daß mehrere Proben gleichzeitig und in kurzer Zeit aufgetrennt werden können. Dabei ist die Mobilität der Proteine sowohl durch die Porengröße bestimmt, wobei die Siebeigenschaften des Gels in einem weiten Bereich frei wählbar sind, wie auch von der Nettoladung der Proteinmoleküle abhängig; letztere wiederum wird vom p_H -Wert des verwendeten Puffers und der vorgegebenen Stromrichtung beeinflusst. Durch geeignete Kombination der Parameter läßt sich ein System mit optimalen Trenneigenschaften herstellen.

5.2.1. Methode

5.2.1.1. Elektrophorese der leichtlöslichen Proteine

Zur Auftrennung der sauren Proteine wurde das von MAURER (1968) beschriebene Gelsystem Nr. 1 verwendet. Für 16 Gele (6 x 80 mm) wurden gemischt:

1. 9,15 g Tris-HCl, p_H 8,9
0,115 ml N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin (SERVA)
in 100 ml Wasser.....5,3 ml
2. 30 g Acrylamid (SERVA), aus Chloroform umkristallisiert
0,8 g N,N'- Methylbisacrylamid (SERVA)

umkristallisiert, in 100 ml Wasser	10,6 ml
3. Wasser.....	5,6 ml
4. 140 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 ml Wasser, frische Lösung.....	21,1 ml

Um eine ebene Geloberfläche zu erzielen, wurde das Gemisch unmittelbar nach dem Gießen mit 100 μ l Puffer überschichtet. Als Kammerpuffer wurde ein Tris- Glycin- Puffer p_H 8,3 (6,0 g Tris, 28,8 g Glycin in 1 l Wasser, ohne Justierung) im Verhältnis 1: 10 verdünnt und zur Frontmarkierung drei Tropfen einer Bromphenolblaulösung (0,01 mg/ml) dem Kathodenpuffer zugesetzt. Nach vollständiger Polymerisation bei Zimmertemperatur wurden 50 bis 100 μ l der auf 10 % Saccharosekonzentration gebrachten Proteinlösungen durch vorsichtiges Unterschichten der über dem Gel stehenden Pufferlösung aufgetragen. Bis zum Eindringen in das Gel wurde eine Stromstärke von 0,5 mA pro Gel angelegt.

Zur Fixierung und Färbung der Proteinbanden wurden die Gele nach 3-stündiger Elektrophorese bei einer Stromstärke von 2 mA pro Röhrchen über Nacht in eine Coomassie- Brilliantblau- Trichloressigsäurelösung (200 ml 20 % ige TCA + 4 ml einer Lösung bestehend aus 0,25 g Coomassie, 91 ml 50 %iges Methanol, 9 ml Eisessig) gegeben. Diese von KUNTZ (1972) beschriebene Färbemethode zeichnet sich dadurch aus, daß sich eine langwierige Entfärbung des Gels erübrigt, weil praktisch nur die Proteinbanden angefärbt werden.

Zur Auftrennung basischer Proteine wurde das Gelsystem Nr 5 von MAURER (1968) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei umgekehrter Polung mit einem 1: 10 verdünnten Glycin- Lutidin- Puffer p_H 8,3 (13,7 g Glycin, 38,2 ml Lutidin auf 1 l Wasser). Die weitere Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

Nach Ausdifferenzierung der Proteinbanden wurden die Gele fotografiert und die Absorption der Banden im Durchlichtdensitometer Vitatron TLD 100 bei gelbgefiltertem Licht ver-

messen. Der Gelvorschub betrug dabei 1 cm/min, die des Schreibers 2 cm/min. Es erwies sich als vorteilhaft, die Gele in 5 % Essigsäure untergetaucht densitometrisch auszuwerten, weil diese den gleichen Brechungsindex wie das Gel besitzt und dadurch Reflexionen vermieden werden, welche durch die gewölbte Geloberfläche und Kratzer hervorgerufen werden.

Zur Dokumentation und ggf. autoradiographischen Auswertung auf Röntgenfilm (Agfa-Gevaert Curix p RP) wurden die Gele anschließend der Länge nach halbiert und in der bei SCHROTT (1973) beschriebenen Weise getrocknet. Da die spezifische Radioaktivität der einzelnen Proteinbanden für den konventionellen autoradiographischen Nachweis zu gering war, wurde versucht, die Methode der Scintillations-Autographie von BONNER und LASKEY (1974) anzuwenden, die zehnmal empfindlicher als die herkömmliche Autoradiographie sein soll. Dazu wurden die Gele langs halbiert, in Dimethylsulfoxid (DMSO) entwässert und anschließend 3 Std in eine Lösung von PPO (2,5- Diphenyloxazol) in DMSO (22,2 g PPO in 100 ml DMSO) gegeben. Das anschließende Wässern der Gele führt zu einem feinverteilten Ausflocken von PPO in den Gelporen und schafft damit einen innigen Kontakt der radioaktiven Substanz mit dem Scintillator. Dabei reagieren die vom ^{14}C emittierten β -Partikel mit PPO unter Lichtemission und verursachen eine lokale Schwärzung des Filmes. Nach der bereits beschriebenen Trocknung wurden die Gele auf Röntgenfilm gelegt und in der Tiefkühltruhe vier Wochen exponiert. Zwar ergab sich bei dieser Methode eine intensivere Schwärzung des Films, aber es mußte dafür eine höhere Unschärfe in Kauf genommen werden, die insgesamt nicht befriedigte.

Um diese Nachteile der Autoradiographie zu umgehen, wurden die Gele in 2 mm starke Scheiben geschnitten, in Scintillationsgläschen gegeben und nach Zusatz von 0,5 ml 30 %igem Perhydropol über Nacht bei 60°C inkubiert. Zur vollständigen Auflösung wurden 0,2 ml Soluene- 100 (Packard) bei Zimmertemperatur zugegeben und weitere 12 Stunden bei 50 °C gehalten. Die nunmehr klare Lösung wurde in 10 ml Dioxan-

Cocktail (100 g Naphtalin, 5 g PPO in 1 l Dioxan) aufgenommen und nach 24 Stunden im Scintillationszähler gemessen. Da nach GOODMAN und MATZURA (1971) die Anwendung von Perhydrol zum Auflösen von Gelen zu Verlusten an radioaktivem $^{14}\text{CO}_2$ führen kann, wurde in einigen Fällen die von den Autoren angegebene Methode angewendet.

5.2.1.2. Elektrophorese der schwerlöslichen Proteine

Um auch die membrangebundenen und schwerlöslichen Proteine in die vergleichenden Untersuchungen mit einzubeziehen, wurden diese mit Detergenzien aus dem nach Extraktion der leichtlöslichen Proteine verbliebenen Rückstand gelöst. Dabei zeigte es sich, daß Natriumdodecylsulfat (SDS) am wirksamsten war. Zugleich führt SDS zu einer Veränderung der Proteine hinsichtlich ihres elektrophoretischen Verhaltens.

Durch Denaturierung der Proteine mit SDS und Auflösung intramolekularer kovalenter Bindungen (Disulfidbrücken) mit Mercaptoäthanol liegen diese als SDS-Protein-Komplexe in Form gestreckter Ellipsoide mit konstanter Querachse und variabler Längsachse vor, die dem Molekulargewicht proportional ist (REYNOLDS und TANFORD, 1970). Die im nativen Zustand aufgrund individueller isoelektrischer Punkte und Ladungsunterschiede bedingte verschiedene elektrophoretische Mobilität der Polypeptide wird durch die negative Ladung der SDS-Anionen im Komplex beseitigt. Infolgedessen ist die Ladung pro Gewichtseinheit konstant und die Mobilität ausschließlich von den Siebeigenschaften des Trenngels abhängig. Durch geeignete Wahl der Porengröße des Gels, und durch Veränderung der Gelkonzentrationen ist eine optimale Auftrennung möglich.

Um einen möglichst breiten Molekulargewichtsbereich zu trennen, wurde nach MIRAULT, SCHERRER und HANSEN (1971) ein SDS-Polyacrylamidgel mit exponentiellem Konzentrationsgradienten verwendet. Für den Gelgradienten wurden folgende Lösungen gemischt:

	Mischgefäß	Reservoir
	5 % Gel	15 % Gel
1 m Tris- HCl, p _H 8,8	2,25 ml	7,50 ml
Wasser	0,89 ml	5,30 ml
10 % SDS	0,06 ml	0,20 ml
30 % Acrylamid+ 0,8 % Bisacrylamid ...	1,00 ml	-----
60 % Acrylamid+ 1,6 % Bisacrylamid ...	-----	5,00 ml
150 mg Ammoniumperoxodisulfat +		
20 ul Temed in 100 ml Wasser	1,80 ml	2,00 ml
Gesamtvolumen	6,00 ml	20,00 ml

Vor der Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat und Temed wurde jedes Gemisch unter dem Vakuum der Wasserstrahlpumpe entlüftet, weil der gelöste Sauerstoff die Polymerisation behindert. Nach der Herstellung der Lösungen wurden die Gefäße verbunden und der volumenkonstante Inhalt des Mischgefäßes über eine Peristaltikpumpe innerhalb von 10 min von unten in den Hohlraum zweier sorgfältig gereinigter Glasplatten gepumpt (innere Weite 115 x 115 x 1,5 mm), die durch untere und seitliche Begrenzungsstege verschlossen waren. Durch einen Gießkamm wurde die Geloberfläche in 16 Probenräume aufgetrennt. Nach vollständiger Polymerisation (30 bis 45 min) wurde der Gießkamm und der untere Begrenzungssteg entfernt und die Gelplatte zwischen die Elektrodengefäße der Elektrophoreseapparatur eingespannt. Als Elektrodenspuffer wurde 0,025 M Tris mit 0,182 M Glycin unter Zusatz von 0,1 % SDS verwendet. Von der aufzutrennenden Proteidlösung, die 1 % SDS, 5 % Mercaptoäthanol, 20 % Glycerin und 2 % einer 0,01 % Bromphenolblaulösung enthielt, wurden jeweils 25 ul auf das Gel aufgetragen und nach einer Eindringzeit von 15 min bei 1/4 der Stromstärke, und anschließend im Kühlschrank bei 10 Watt betrieben. Die Elektrophorese war beendet, wenn die Bromphenolblaubande das anodische Ende des Gels bis auf 10 mm erreicht hatte. Daran anschließend wurde das Gel zur Fixierung der Banden mehrere Stunden in 50 % TCA gebracht. Die Färbung erfolgte in einer auf 30 °C angewärmten Lösung von 250 mg Amido Schwarz B in

45 ml Methanol, 45 ml Wasser und 10 ml Eisessig für 1 Std. Zur Entfärbung und Differenzierung der Banden wurde das Gel in eine Entfärbelösung aus 7 % Eisessig und 5 % Methanol gelegt, die solange gewechselt wurde, bis sich die Banden deutlich von der fast farblosen Gelmatrix unterschieden.

Photographie und densitometrische Auswertung erfolgten wie unter 5.2.1.1. beschrieben. Die entfärbten Gele wurden in 5 % Essigsäure aufbewahrt oder zum Zweck der Autoradiographie auf einer Fritte unter Wasserstrahlpumpenvakuum getrocknet.

5.2.2. Ergebnisse

5.2.2.1. Auftrennung der löslichen Blattproteine

Zunächst bereitete die Auftrennung der Blattextrakte, die in gleicher Weise wie für die Gelchromatographie mit Sephadex gewonnen waren, Schwierigkeiten, weil ein Teil der Proteine nur wenig in das Gel eindrang und daher nicht weiter aufgetrennt wurde. Dieser Effekt, der auch nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung auftrat, ist offenbar darauf zurückzuführen, daß sich Proteinaggregate bilden, die größer sind als die Gelporen und diese verstopfen. Nach LOOMIS und BATAILLE (1966) können diese Aggregate dadurch entstehen, daß die in Pflanzen weit verbreiteten phenolischen Inhaltsstoffe mit Proteinen Komplexe bilden. Überdies werden die Phenole sowohl durch Sauerstoff, wie auch durch Phenoloxidasen und Peroxidasen zu Chinonen oxidiert, welche polymerisieren und kovalente Bindungen mit Proteinen eingehen. Diese Oxidation war in den Extrakten vorwiegend älterer Blätter an einer zunehmenden Farbvertiefung erkennbar und weder durch Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidans bei p_H 8,4 bis 9,5, oder durch Homogenisieren unter Stickstoff zu verhindern. Dagegen konnte die nachträgliche Chinonbildung und Proteinausfällung durch den Zusatz von 0,5 g festem Polyvinylpyrrolidon (PVP), das die phenolischen Substanzen im Extrakt bindet (je Gramm Blattfrischgewicht bei p_H 7,5), weitgehend ausgeschlossen werden. Dafür mußte

allerdings in Kauf genommen werden, daß ein Teil des Extraktes nach der Zentrifugation im sedimentierten PVP-Brei adsorbiert wurde.

Nach dieser Behandlung ergab sich eine gute Auftrennung der Proteine, die auch in mehreren Parallelgelen ein reproduzierbares Bandenprofil ergaben. Die densitometrische Auswertung eines Blattextraktes nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung bei 40%, 55% und 70% ist als Beispiel in den folgenden Abbildungen dargestellt (Abb. 11, 12, 13). Wie die Gegenüberstellung der Densitogramme von im Kurztag gehaltenen und mit 3 Tagen Dauerlicht induzierten Blättern zeigt, so sind auf den ersten Blick gewisse Unterschiede zu erkennen; diese betrafen jedoch von Versuch zu Versuch wechselnde Bereiche, waren also für eine bestimmte Bande nicht reproduzierbar und sind deshalb bestenfalls als quantitative, nicht aber als signifikante qualitative Unterschiede im Proteinmuster zu werten.

Der Einbau von ^{14}C -Leucin in die Proteine der einzelnen Banden ließ sich mittels Autoradiographie nicht nachweisen. Auch nach 4-wöchiger Exponierung war nur in wenigen Banden die Markierung hoch genug, um den Röntgenfilm lokal zu schwärzen. Da eine höhere spezifische Markierung der Proteine nicht erreicht werden konnte, wurden die Gele in einzelne Scheiben zerschnitten und die Radioaktivität der Scheiben bestimmt. Abgesehen davon, daß durch den Schnitt einzelne Banden in der Mitte geteilt wurden und sich dadurch die Radioaktivität "verschmierte", lag die Aktivität nur unwesentlich über dem Background. Es wurde daher zugunsten einer höheren spezifischen Aktivität auf die Vortrennung mit Ammoniumsulfat verzichtet und der Rohextrakt aufgetrennt. Das Ergebnis eines von vielen derartigen Versuchen stellt die Abbildung 14 dar.

Wie auch hier der Vergleich der Proteine aus induzierten (Dauerlicht) und nichtinduzierten (Kurztag) Blättern zeigt, ist die Verteilung der Proteine unter beiden Bedingungen identisch und bietet keine Hinweise auf ein de-novo gebildetes

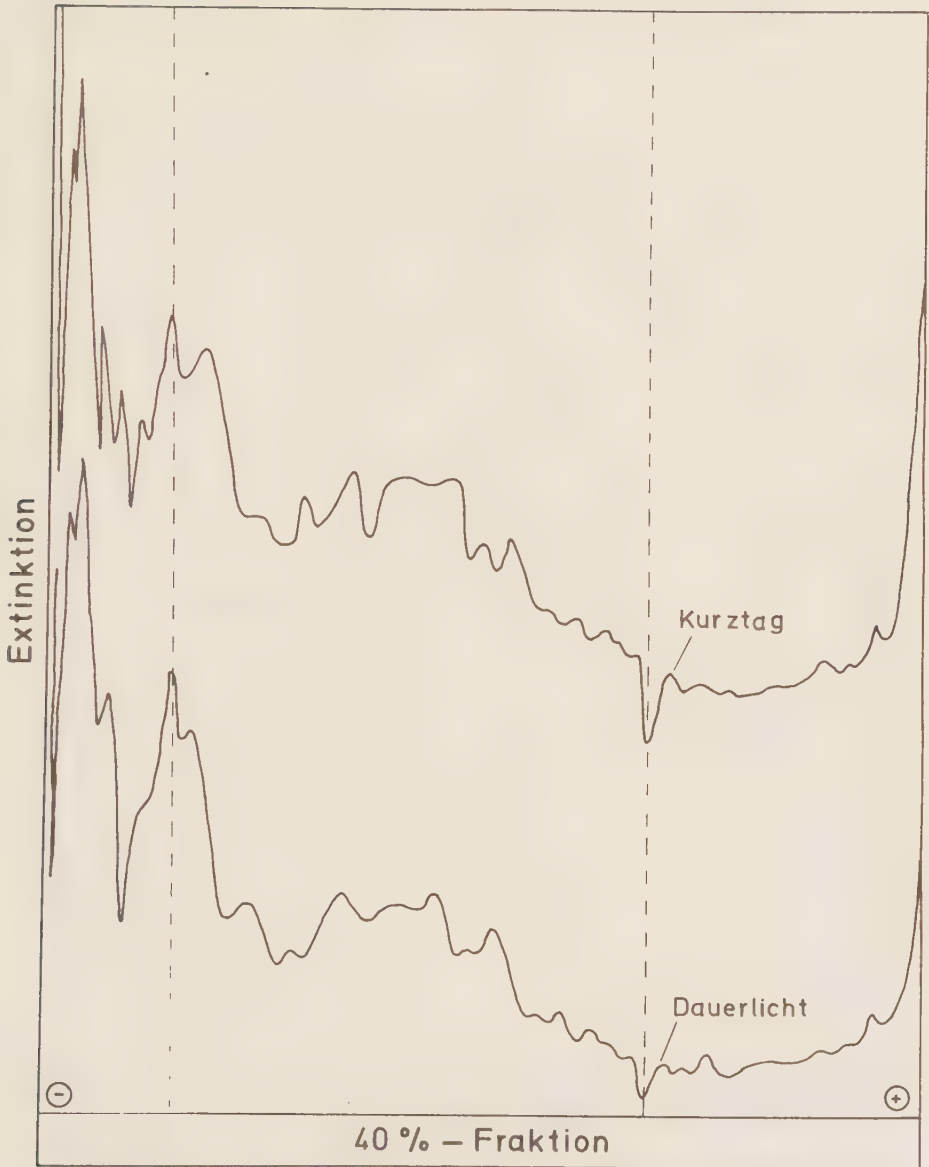


Abb. 11:

Polyacrylamidgel-Elektrophorese der mit Ammoniumsulfat fraktio-
niert gefällten löslichen Proteine von H.n. nach induzierenden
(Dauerlicht) und nichtinduzierenden (Kurztag) Photoperioden.
- 40 % - Fraktion. Absorption nach Anfärbung.

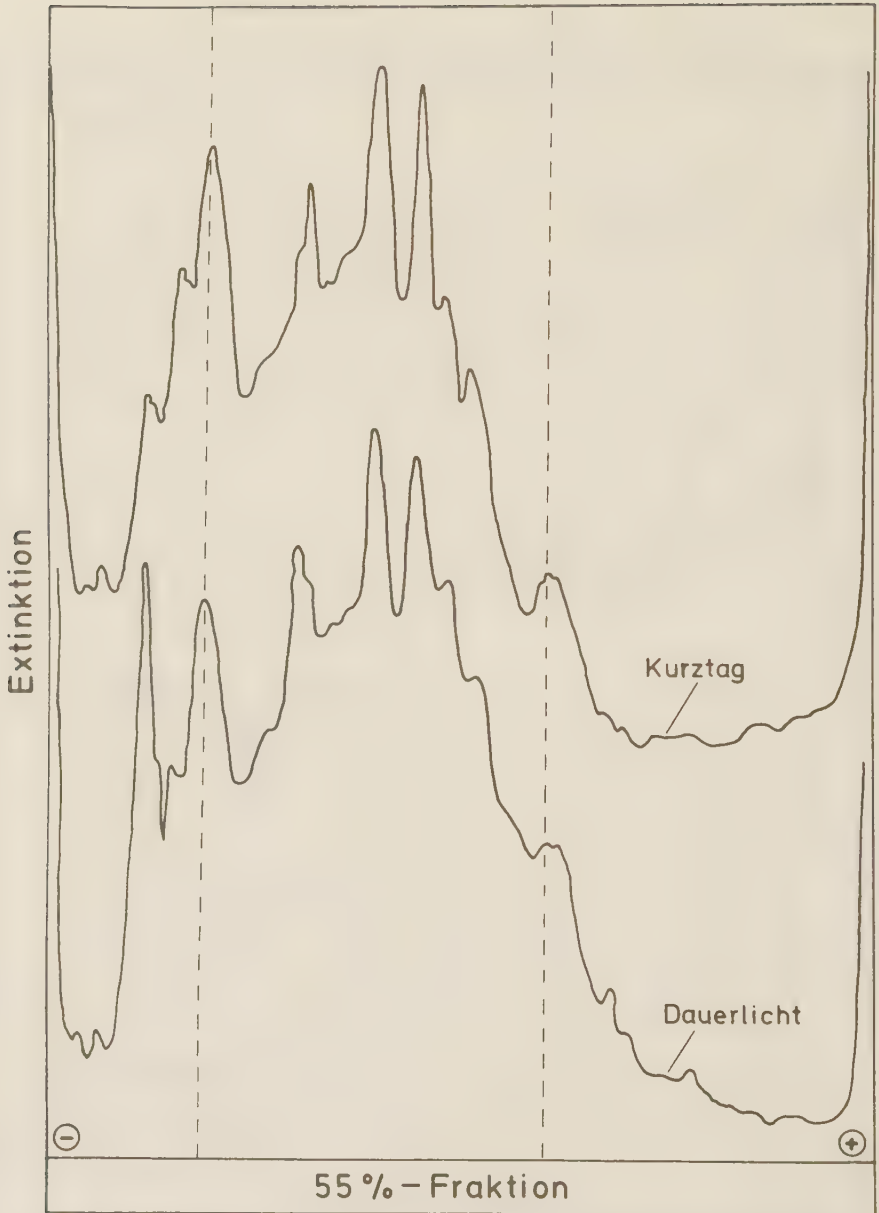


Abb. 12:

Wie Abbildung 11; 55 % - Ammoniumsulfat-Fraktion

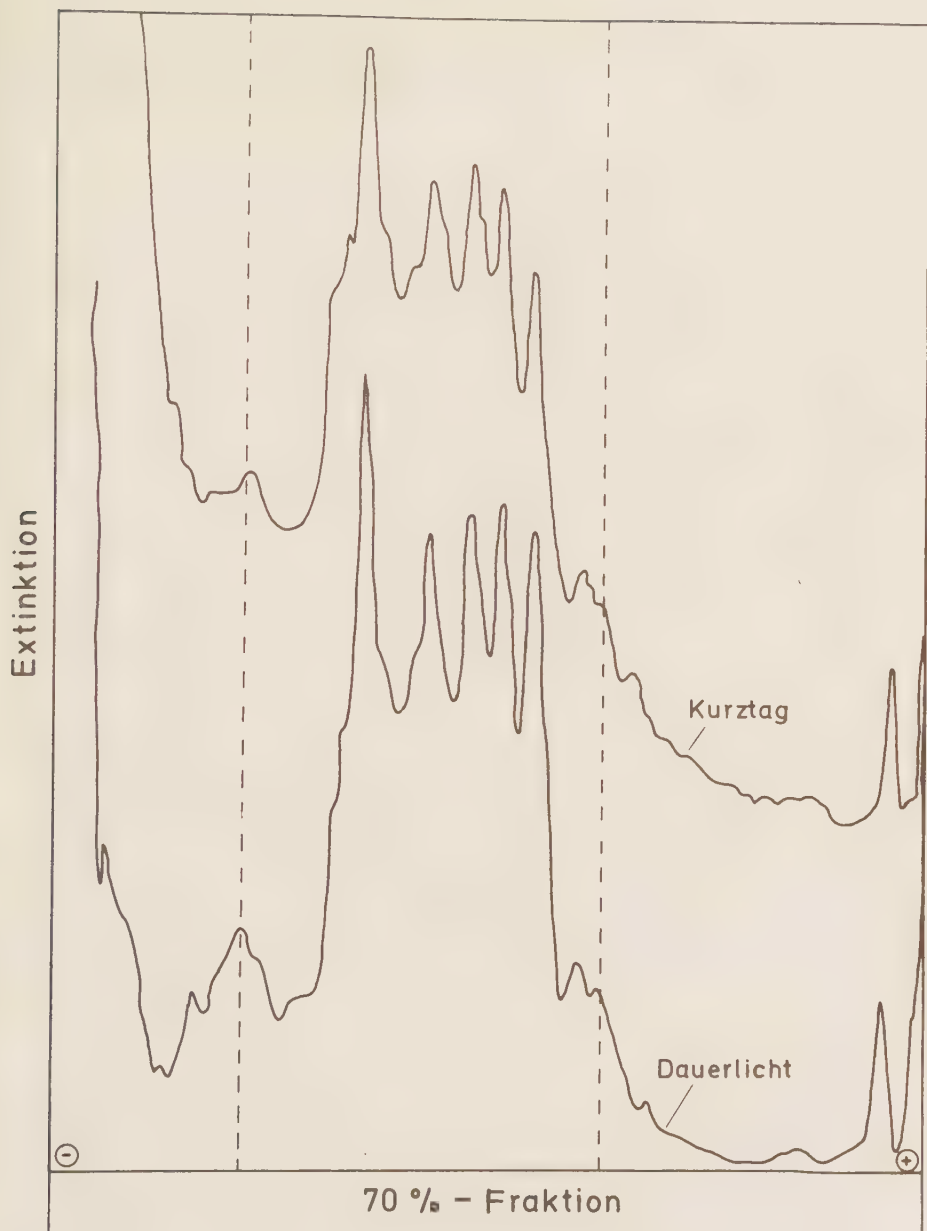


Abb. 13:

Wie Abbildung 12; 70 % - Ammoniumsulfat-Fraktion

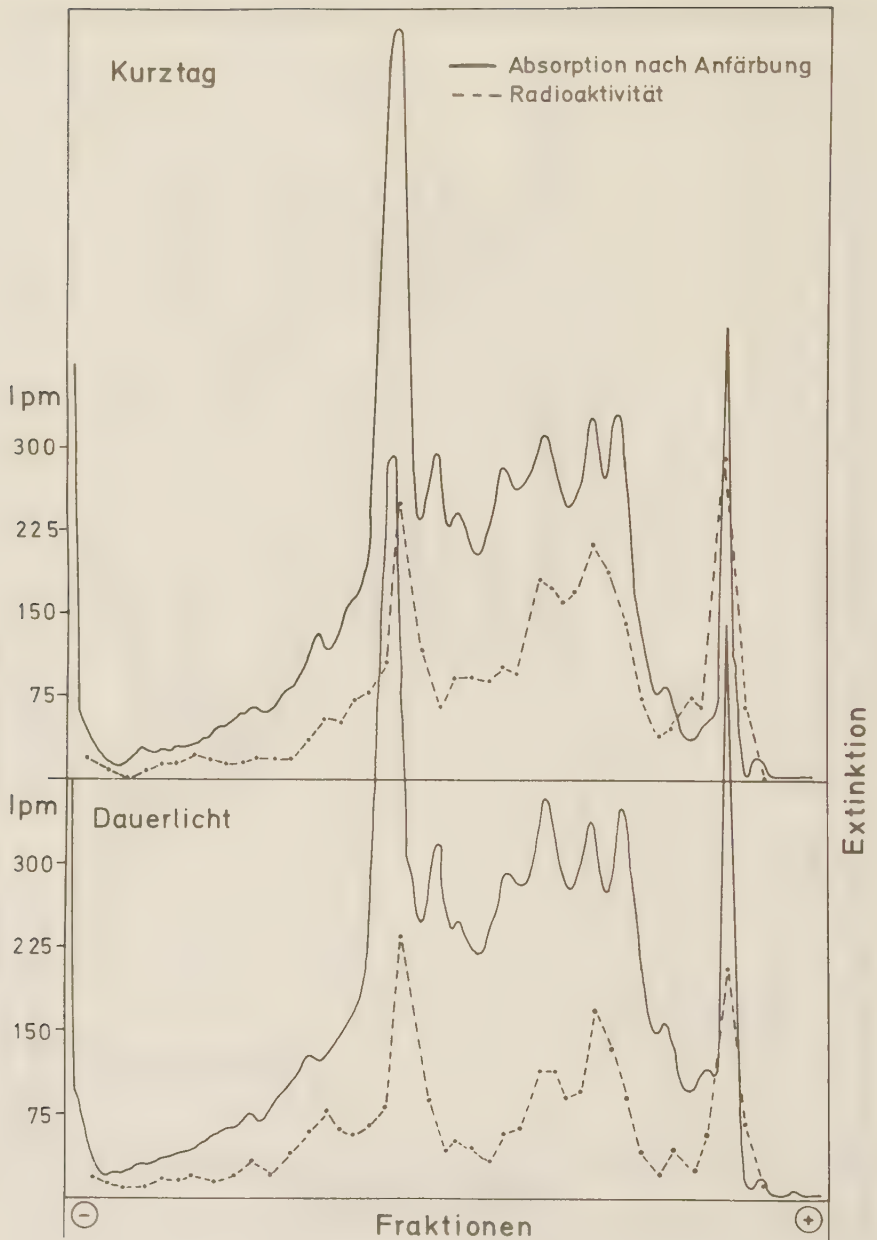


Abb. 14:

Polyacrylamidgel-Elektrophorese der löslichen Proteine von induzierten (Dauerlicht) und nichtinduzierten (Kurztage) Pflanzen. Vergleich der Protein- und Radioaktivitätsverteilung.

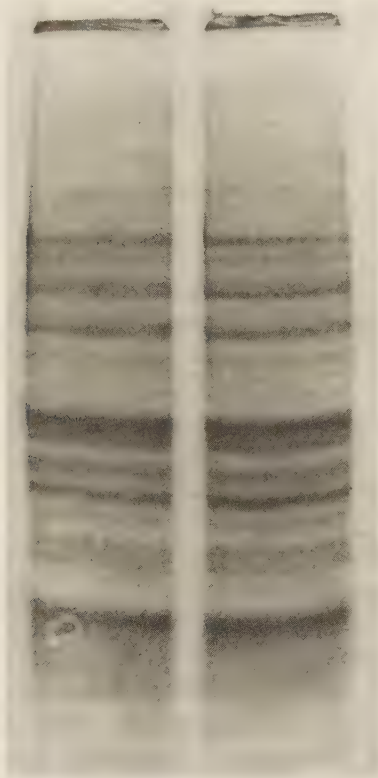
Enzym. Auch die Verteilung der Radioaktivität entspricht im wesentlichen dem Bandenmuster.

5.2.2.2. SDS-Elektrophorese der schwerlöslichen Proteine

In den vorangegangenen Abschnitten wurde wiederholt die Frage aufgeworfen, ob die Induktion der Blütenbildung nicht an Transportvorgänge gebunden ist. Nach KANDELER (1972) könnte die Induktion in der Weise erfolgen, daß die phytochromgesteuerten Permeabilitätsänderungen an den Plasmamembranen den Transport eines im Blatt gebildeten Stimulus zum Vegetationskegel ermöglichen. Die im Abschnitt 7.2. festgestellte Aufnahmehemmung für Leucin durch das blühinduzierende Cycloheximid spricht ebenfalls dafür, daß Vorgänge an den Membranen für den Induktionsvorgang entscheidend sind. Es ist daher denkbar, daß unter induzierenden Bedingungen strukturelle Änderungen der Plasmamembran oder Neusynthesen spezifischer Carrier erfolgen.

Um die membrangebundenen Proteine in die Untersuchungen mit einzubeziehen, wurde der nach Extraktion der leichtlöslichen Proteine verbliebene Rückstand mit Detergenzien weiterbehandelt. Anfängliche Versuche mit den Detergenzien Triton X 100 und Brij ergaben in der nachfolgenden Elektrophorese des Extraktes nur wenige scharfe Banden. Eine optimale Extraktion und Auftrennung war dagegen nur mit Natriumdodecylsulfat (SDS) zu erreichen. Die Trenneigenschaften wurden durch die Verwendung eines Gelgradienten von 5 % bis 15 % (nach LAMBIN et al., 1976) für einen weiten Molekulargewichtsbereich erweitert. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs ist in Abbildung 15 dargestellt; ein Vergleich des Bandenmusters nach SDS-Elektrophorese von schwerlöslichen Proteinen aus induzierten und nichtinduzierten Pflanzen zeigt keinen Unterschied. Dies schließt allerdings nicht aus, daß Veränderungen an der Membran auftreten, die sich allerdings nur auf die Konformation bestimmter Proteine beschränken; derartige Konformationsänderungen entziehen sich jedoch

bislang dem biochemischen Nachweis und der denaturierenden Elektrophorese.



Kurztag

Dauerlicht

Abb. 15:

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Gelgradient: 5% - 15%) der schwerlöslichen Proteine nach verschiedener photoperiodischer Behandlung. Links: Proteinmuster unter nichtinduktiven Bedingungen; rechts: nach Induktion mit 3 Tagen Dauerlicht.

6. Einfluß blühinduzierender Bedingungen auf die Aktivität einiger Enzyme im Blatt.

Wenn tatsächlich keine de-novo Synthesen von Proteinen nach photoperiodischer Behandlung auftreten würden, so wäre es doch möglich, daß Veränderungen der Enzymaktivitäten zu beobachten sind. HEDLEY und STODDART (1971) untersuchten die Aktivität der Alanin-Aminotransferase (Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GPT) im expandierten 5. Blatt von *Lolium temulentum* nach acht- und sechzehnständiger Photoperiode. Sie fanden eine erste tageslängenunabhängige und eine zweite Phase, die von einem starken Aktivitätsverlust begleitet war, der durch Langtag-Bedingungen gefördert wurde. Während die Autoren unter Verwendung verschiedener Langtag- und Störlicht-Bedingungen zu dem Ergebnis kamen, daß die GPT-Aktivität nicht direkt an die Blühinduktion gekoppelt, sondern vielmehr ein Indikator der Seneszenz ist, fanden SRIVASTAVA und SIROHI (1975) eine strenge Koppelung der Aminotransferasen-Aktivität an die verschiedenen Entwicklungsprozesse. Die Autoren untersuchten die Transaminierungsreaktionen in Bezug auf Blütendifferenzierung in den Blattspitzen von Weizen. Dabei fanden sie, daß die Aktivität aller drei untersuchten Systeme (Glutamat- Glyoxylat; Glutamat- Pyruvat; Alanin- Glyoxylat) während der vegetativen Phase bis zur Bildung reproduktiver Kegel zunimmt und bei beginnender Blütendifferenzierung stark abnimmt.

In zahlreichen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivitäten des Tricarbonsäurezyklus (MDH) und des oxidativen Pentosephosphat-Zyklus (G 6-PDH und 6-P-GDH) eine endogene Rhythmik ihrer Aktivität besitzen (DEITZER et al., 1974). Aus den endogenen Oscillationen der NAD- und NADP- abhängigen GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase), deren Amplitude durch Phytochrom kontrolliert ist (FROSCH und WAGNER, 1972) wurde die Hypothese entwickelt, daß Photomorphogenese und Photoperiodismus durch die circadiane Rhythmik des Energiemetabolismus gesteuert werden. Die autonomen rhythmischen Schwankungen waren demnach die Zeitgeber der photoperiodischen Zeitmessung. Die daraus abgeleitete Membran-Oscillator-Hypothese (WAGNER, FROSCH und DEITZER, 1974), nach der Phytochrom die rhythmischen Konformationsänderungen von Membranbausteinen beeinflusst, die wiederum zu signalartigen Änderungen im Redox- oder Energiezustand führen, fügen sich in die Vorstellung, daß Veränderungen der Membraneigenschaften auch den Transport einer unter induzierenden Bedingungen gebildeten blühstimulierenden Substanz fördern könnten.

Die Befunde ließen es deshalb angebracht erscheinen, die Aktivitäten der NAD- GAPDH (E.C. 1.2.1.12), der NADP- GAPDH (E.C. 1.2.1.13) und der GPT (E.C. 2.6.1.2) zu untersuchen. Es sollte dabei überprüft werden, ob 45 minütiges Hellrot-Störlicht in der Mitte der Dunkelperiode die Enzymaktivitäten gegenüber der Kontrolle ändert. Durch diese Bedingung läßt sich die Blütenbildung an *Hyoscyamus* induzieren (siehe Tab. 4). Um eine eventuelle Beteiligung des Phytochromsystems zu zeigen, wurde auch eine Belichtung mit Dunkelrot, sowie ein Revertierungsversuch mit der einer Hellrotbelichtung folgenden Dunkelrotgabe durchgeführt.

6.1. Methode

Die Enzymtests wurden in folgender Weise durchgeführt: Die Extraktion der mit dem jeweiligen Lichtprogramm belichteten Pflanzen (jeweils 1 Blatt) erfolgte mit dem dreifachen Volumen eines Puffers, bestehend aus 0,1 M Tris-HCl, p_H 8,0;

10 mM MgCl_2 , 1 mM DTE unter Zusatz von 1 % PVP 40 (Polyvinylpyrrolidon, Sigma, USA) zur Adsorption phenolischer Komponenten. Der Rohextrakt wurde für 60 min bei 105.000 $\times g_{av}$ zentrifugiert, der Proteingehalt des gelbgrünen Überstandes nach der Methode von LOWRY et al., (1951) aus dem Aliquot bestimmt und für die Bestimmung der Enzymaktivitäten nach LATZKO und GIBBS (1968) verwendet. Für die Enzymtests wurden folgende Substanzen eingesetzt:

NAD- GAPDH:

100 μM Tris-HCl, p_H 8,0; 10 μM MgCl_2 , 10 μM Glutathion, 6 μM ATP, 0,2 Einheiten 3-PGS-Kinase, 0,2 μM NADH, 100 μl Extrakt. Nach Inkubation des Gemisches für 2 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zusatz von 2 μM 3-Phosphoglycerinsäure gestartet.

NADP- GAPDH:

Anstelle von NADH wurden 0,2 μM NADPH und 50 μl Extrakt in den Testansatz gegeben. Im übrigen wurde verfahren, wie oben angegeben.

GPT:

Auf 1 ml Testansatz wurden pipettiert: 750 μl Kaliumphosphatpuffer 50 mM p_H 7,5 mit 95 mg L-Alanin / ml; 75 μl Wasser, 20 μl NADH (0,01 M), 5 μl LDH, 100 μl Extrakt. Nach Inkubation für 2 min wurde die Reaktion mit 50 μl α -Ketoglutarat (30 mg/ml) gestartet.

Der Verbrauch an NADH bzw. NADPH wurde an der Extinktionsabnahme bei 340 nm im Beckman Spektralphotometer Mod. 24 für die Dauer von 2 min verfolgt.

6.2. Ergebnisse

In Tabelle 11 sind die Aktivitäten der NADP - und NAD- GAPDH und der GPT nach verschiedenen Belichtungen zusammenfassend dargestellt. Wie den Werten zu entnehmen ist, sind keine signifikanten Unterschiede der Enzymaktivitäten zwischen den einzelnen Belichtungsprogrammen zu beobachten. Innerhalb der 6 durchgeführten Parallelversuche bestand überdies eine

Tab. 11:

Enzymaktivitäten in $\Delta E \times 1000 / \text{min} \times \text{mg Protein im Blattextrakt von}$
 Hyoscyamuspflanzen nach verschiedener Belichtung. Bei Farblight er-
 folgte der Enzymst in unmittelbarem Anschluß an die Strahlungsgebe (45 min).

Lichtbedingung	Enzymaktivitäten					
	Dunkel	Hellrot	Dunkelrot	Hellrot + Dunkelrot	Dunkelrot + Hellrot	Weißlicht
NAD - GAPDH	1780 $\pm$ 240	1650 $\pm$ 160	2080 $\pm$ 190	1950 $\pm$ 80	1740 $\pm$ 130	2480 $\pm$ 190
NADP- GAPDH	2450 $\pm$ 305	2020 $\pm$ 205	2750 $\pm$ 280	2460 $\pm$ 175	1950 $\pm$ 90	2860 $\pm$ 120
GPT	2050 $\pm$ 180	1950 $\pm$ 110	2250 $\pm$ 150	2300 $\pm$ 95	2210 $\pm$ 200	2580 $\pm$ 130

starke Streuung der Meßwerte, da die Enzymaktivitäten zwischen den einzelnen Belichtungsprogrammen anscheinend auch vom Entwicklungsstadium der Blätter abhängig sind. So war es in keinem Fall möglich, in verschiedenen Blättern ein und derselben Pflanze die gleiche Enzymaktivität (bezogen auf den Proteingehalt) zu messen. Da ein Zusammenhang zwischen Belichtung und dem Blüherfolg hergestellt sein sollte, wurden die Versuchspflanzen dem Störlichtprogramm (siehe 3.1.2.) entnommen. Aus der begrenzten Zahl der Störlichtversuche ergab sich zwangsläufig, daß auch die Enzymtests nicht unbegrenzt wiederholt werden konnten. Aus dem Ergebnis läßt sich folgern, daß über die Streubreite von $\pm 10\%$ hinausgehende Veränderungen der Enzymaktivitäten nach der phytochromwirksamen Hellrotbelichtung gegenüber der Dunkelkontrolle oder Dunkelrot-bestrahlten Pflanzen nicht auftreten. Dies läßt es als sehr zweifelhaft erscheinen, daß blühwirksames Störlicht seine induzierende Wirkung über eine Veränderung der Enzymaktivität einleitet.

7. Induktion der Blütenbildung durch Cycloheximid

Der letzte Teilprozeß der Blühinduktion ist die Realisierung des Blühbefehles. Mit Hemmstoffen der Transskription und Translation konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß entsprechend anderen Photoregulationen auch bei der Blühinduktion eine differentielle Genaktivierung stattfindet (MOHR, 1966). Obwohl der Vegetationspunkt das den Blühbefehl realisierende Organ ist, muß es nicht zwangsläufig auch der Ort sein, an welchem die Gendereprimierung und deren Folgeprozesse stattfinden. Nach HESS (1959) wäre es auch möglich, daß eine bereits im Blatt gebildete m-RNS zum Vegetationspunkt transportiert wird.

EICHHOFF und RAU (1969) konnten durch Applikation des Basenanalogen 2-Thiouracil (2-TU), einem Hemmstoff der Transskription, auf den Vegetationspunkt von H.n. die Blütenbildung verhindern; bei Infiltration ins Blatt dagegen wurde Blütenbildung im Kurztag induziert. Das gleiche Ergebnis erhielten KLAUTKE und RAU (1973) mit dem als Hemmstoff der Proteinsynthese beschriebenen Cycloheximid (CHI). Demnach wären, im Einklang mit anderen Befunden (EVANS et al., 1970; ROSS, 1970), die entscheidenden transskriptorischen und translatorischen Vorgänge am Vegetationspunkt lokalisiert. Die blühinduzierende Wirkung der beiden Substanzen nach Blattinfiltration ließe sich dagegen auf der Basis der "Blühhemmstoff-Hypothese" (DENFFER, 1950) erklären. Derzufolge würde ein unter nichtinduktiven Bedingungen im Blatt

gebildeter Hemmstoff die Blütenbildung direkt oder nach WELLENSTIEK (1970) die Synthese eines Blühstimulus verhindern. CHI und 2-TU könnten die Synthese des Blühhemmstoffes blockieren und dadurch die Differenzierung von Blütenanlagen freigeben. Dieser Hypothese widerspricht jedoch, daß auch Infiltration nur eines Teils der Blätter zur gleichen Blütrate führt (KLAUTKE und RAU, 1973).

Dieser Widerspruch zeigt das Problem, Blüteninduktion durch Hemmstoffe zu erklären. Die im folgenden Abschnitt dargestellten Versuche sollten zu einem besseren Einblick in den Mechanismus der blühinduzierenden Wirkung von Cycloheximid führen.

7.1. Wirkung von Cycloheximid auf die Blühinduktion

7.1.1. Additive Wirkung von CHI-Infiltration und photoperiodischer Behandlung.

KLAUTKE und RAU (1973) konnten zeigen, daß CHI mit subkritischen Induktionen, die allein noch keine Blütenbildung auslösen, additiv wirksam ist. Während 1 Tag Dauerlicht oder 3 Tage mit Störlicht noch unter der Induktionsschwelle lagen, erreichten sie durch Kombination mit CHI eine Blütrate von 72 % bzw. 80 %, also höher als mit CHI allein. Dies führte zu der Überlegung, daß auch unter nichtinduzierenden Bedingungen blühfördernde Prozesse ablaufen könnten, die für sich allein jedoch noch nicht ausreichend sind, den Kippvorgang für die Produktion von Blütenanlagen auszulösen. Damit müßte es möglich sein, subkritische Induktionsvorgänge mit CHI soweit zu optimieren, daß sie an ihrer Blütrate erkennbar werden. Dazu wurde folgender Versuch angesetzt:

Eine Gruppe der Versuchspflanzen wurde in der üblichen Weise mit CHI (2×10^{-5} M) infiltriert und in 6 Untergruppen aufgeteilt, die anschließend jeweils für die Dauer von 8 Behandlungstagen Tageslängen von 9 bis 14 Stunden erhielten. Die Kontrollgruppe wurde mit Wasser infiltriert und sonst in

gleicher Weise wie die CHI-behandelten Pflanzen belichtet.
Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt;

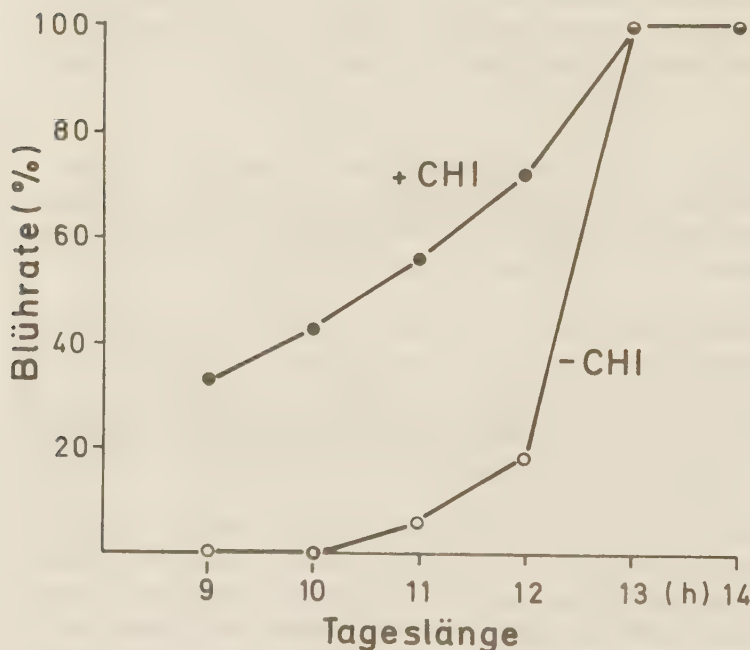


Abb. 16:

Additive Wirkung einer einmaligen CHI- Infiltration ($2 \times 10^{-5}M$) mit 8 nachfolgenden Hauptlichtperioden von unterschiedlicher Dauer. Mittelwert von 3 Versuchen mit 16 Pflanzen pro Versuchsgruppe.

sie zeigt, daß ohne CHI-Vorinfiltration Lichtperioden von 9 und 10 Stunden deutlich unter der kritischen Tageslänge liegen; während eine Belichtungsdauer von 11 und 12 Stunden eine noch geringe Blütrate aufweisen, erfolgt zwischen 12 und 13 Stunden eine deutliche Zunahme der Blütrate auf 100 %. Demgegenüber wird durch CHI-Vorinfiltration bereits bei 9 Stunden Tageslänge eine Blütrate von 33 % induziert, die mit Verlängerung der Belichtungszeit kontinuierlich zunimmt. Daraus ist zu folgern, daß in subkritischen Tages-

längen bereits blühfördernde Prozesse ausgelöst werden, die jedoch noch nicht ausreichen, die Umsteuerung auszulösen. In Verbindung mit CHI werden diese Vorgänge soweit gefördert, daß sie sich in einer apparenten Blütrate ausdrücken.

7.1.2. Einfluß von CHI auf die durch Gibberellin ausgelösten Induktionsvorgänge.

Wie in Abschnitt 4.1.3. dargestellt wurde, induziert bei Infiltration in die Blätter von den Phytohormonen nur Gibberellin in gewissem Umfang Blütenbildung. Um festzustellen, ob sich Gibberellin und CHI in ihrer blühinduzierenden Wirkung ergänzen, wurden die Substanzen sowohl einzeln, als auch gemeinsam den Blättern von H.n. im Kurztag appliziert. Dies erfolgte in der Weise, daß jeweils CHI in der für die Blühinduktion optimalen Konzentration von 3×10^{-5} M oder Gibberellin (20 ug/Pflanze) in der beschriebenen Weise infiltriert wurden. Bei der Kombination der beiden Substanzen wurde ein zeitlicher Abstand von 2 Tagen zwischen den beiden Infiltrationen gewählt, um die Wirkung der Erstinfiltration zu etablieren. Das Ergebnis als Mittelwert aus drei Versuchen ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tab. 12:

Wirkung einmaliger Infiltrationen von CHI und Gibberellin und deren Kombinationen auf die Blütenbildung, Sproßstreckung und Sproßlänge von Hyoscyamus.

Substanz	Pflanzen	mit Blüten		mit Sproßstreckung		
	Zahl	Zahl	%	Zahl	%	Sproßlänge(mm)
CHI	22	8	36	0	0	0
Gibb.	24	11	46	19	79	6,69 $\pm$ 1,99
CHI+Gibb.	23	10	44	18	78	1,33 $\pm$ 0,85
CHI+CHI	24	9	38	0	0	0
Gibb+CHI	22	12	55	18	82	2,33 $\pm$ 0,78
Gibb+Gibb	22	13	59	21	95	10,80 $\pm$ 2,30

Betrachtet man den Effekt von Gibberellin und CHI jeweils einzeln, so ist festzustellen, daß Gibberellin eine nur etwas höhere Blütrate induziert als CHI, zugleich aber auch eine deutliche Sproßverlängerung, die nach CHI- Infiltration in keinem Fall zu beobachten war. Die Kombination mit CHI als Erstinfiltration erhöht die Blütrate der nachfolgenden Infiltration weder mit Gibberellin noch mit CHI. Vielmehr übt CHI einen Hemmeffekt auf die durch Gibberellin geförderte Sproßverlängerung aus, ohne jedoch den Prozentsatz der geschossten Pflanzen zu vermindern. Wie der reziproke Versuch mit Erstinfiltration von Gibberellin und nachfolgend CHI aufzeigt, ist die Reihenfolge der Zufuhr der beiden Substanzen unwesentlich. Demnach läßt sich durch Kombination von CHI und Gibberellin keinesfalls eine Steigerung der Induktionsrate erzielen, die der numerischen Summe der Einzelwirkungen (82 % Blütrate) entsprechen würde. Dies gilt auch nicht für eine zweimalige Infiltration mit Gibberellin, die zwar eine deutliche, aber keinesfalls additive Steigerung der Blütrate ergibt. Dagegen scheint die Sproßlänge unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Meßwerte der Menge an appliziertem Gibberellin zu entsprechen (siehe auch Abb. 9).

7.2. Differentielle Hemmung der Aufnahme und des Einbaus von Aminosäuren durch Cycloheximid.

Die für die blühinduzierende Wirkung von CHI wesentliche Frage, ob CHI spezifisch die Proteinsynthese hemmt, wurde häufig gestellt und ist aufgrund der zahlreichen anderen Berichte über CHI- Wirkungen noch immer unbeantwortet. Neben einer Hemmung der Translokase am 80 S- Ribosom (ENNIS, 1964; SIEGEL und SISLER, 1964; KENNEY, 1967; RAJALAKSHMI et al., 1971; SPENCER, 1973), wird auch eine Wirkung auf die Synthese von Nukleinsäuren (STANNERS, 1966; SALLING, 1971; FOURY, 1973; FELDMANN, 1973) und auf den Energiehaushalt beschrieben (COCUCCI und MARREE, 1973; MC DONALD und ELLIS, 1969; BRINCKMANN und LÜTTGE, 1974). Für unser Problem von besonderer Bedeutung sind Berichte, wonach CHI auch den Transport und die Aufnahme beeinflusst. EVANS (1971) konnte zeigen, daß

CHI die Aufnahme von 2,4- DNP und Glukose durch Euglena hemmt. Er führt diesen Effekt darauf zurück, daß ein p_H -Gradient zwischen Innen- und Außenseite der Zelle abnimmt oder daß die Eigenschaften der Membranen direkt verändert werden. Eine Hemmung des Leucintransports durch CHI fanden HUNTNER und Mitarbeiter (1973). Sie begründeten dies damit, daß CHI das membrangebundene Ca^{2+} , das beim Transport beteiligt ist, labilisiert, wodurch es seine Funktion nicht mehr ausüben kann.

Die teilweise widersprüchlichen Befunde ergeben sich daraus, daß es sehr schwierig, wenn nicht unmöglich ist, zwischen Einbau und Aufnahme einer von außen gereichten Aminosäure zu unterscheiden. Je nach Versuchsmaterial und Versuchsdurchführung muß die applizierte Substanz zunächst mehr oder weniger starke Gewebe, Zellwände und cytoplasmatische Membranen überwinden, bevor sie an den Ort ihrer Bestimmung gelangt. Eine Verminderung der Membranpermeabilität, Veränderungen der Bindungsstellen oder Blockierung der spezifischen Carrier führt daher zwangsläufig zu dem Erscheinungsbild einer gehemmten Proteinsynthese.

Ein Weg, dennoch zwischen den beiden Prozessen, - Hemmung von Aufnahme und Einbau - , zu unterscheiden, entsprang folgender Überlegung: Wenn CHI die Proteinsynthese unmittelbar hemmt, dann muß der Einbau von außen zugegebener Aminosäuren in gleichem Umfang wie der endogen synthetisierter reduziert werden; sollte jedoch primär die Aufnahme blockiert sein, dann dürfte der Einbau endogener Aminosäuren nicht beeinträchtigt werden. Die Bereitstellung eines pools an endogen synthetisierten und radioaktiv markierten Aminosäuren sollte durch photosynthetische Fixierung von $^{14}CO_2$ möglich sein, das als Kohlenstoffgerüst in die Aminosäuren eingebaut wird. Dies setzt allerdings voraus, daß die Rate der Netto- CO_2 -Fixierung nach CHI- Einwirkung nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

7.2.1. Einfluß von Cycloheximid auf die Netto-CO₂-Fixierung

Um den möglichen Einfluß einer CHI-Infiltration auf die nachfolgende Netto-CO₂-Fixierung zu ermitteln, wurde eine Kinetik aufgestellt, in der die Versuchspflanzen verschiedene Zeit nach CHI-Einwirkung entsprechend der unter 3.2.1.1.1. beschriebenen Methode mit ¹⁴CO₂ inkubiert wurden. Um einen Infiltrationseffekt auszuschließen, wurden Kontrollpflanzen mit Wasser infiltriert und in gleicher Weise behandelt. Nach einer Einbauzeit von jeweils 6 Stunden wurden die Pflanzen in der beschriebenen Weise (Abschnitt 3.2.1.1.2.) aufgearbeitet. In Tabelle 13 ist die Gesamtfixierung von ¹⁴CO₂ bezogen auf den Proteingehalt und die Einbauzeit angegeben.

Tab. 13:

Gesamtfixierung von ¹⁴CO₂ verschiedene Zeit nach Infiltration der Blätter mit CHI oder Wasser. Einbaurate in pCi/mg Protein x Stunde.

	Gesamtfixierung von ¹⁴ C				
Stunden nach Infiltration	0	6	24	48	72
mit CHI (3x10 ⁻⁵ M)	2.801	3.129	2.311	2.535	2.745
mit Wasser	2.851	2.971	2.510	2.696	2.816
Einbaurate	98	105	92	94	97
CHI/Wasser in %					

Wie die Werte zeigen, ist die Fixierungsrate nach Infiltration mit CHI über die gesamte Dauer des Versuches weder absolut, noch im Vergleich mit der Wasserkontrolle vermindert. Unter der Annahme, daß die im Syntheseweg der Aminosäuren tätigen Enzyme durch CHI nicht selektiv gehemmt werden, läßt sich aus den Ergebnissen folgern, daß auch die Menge an endogen markierten Aminosäuren entsprechend den Werten der Gesamtfixierung von der Vorinfiltration unabhängig ist.

7.2.2. Vergleich des Einbaus von $^{14}\text{CO}_2$ und ^{14}C -Leucin nach Einwirkung von Cycloheximid

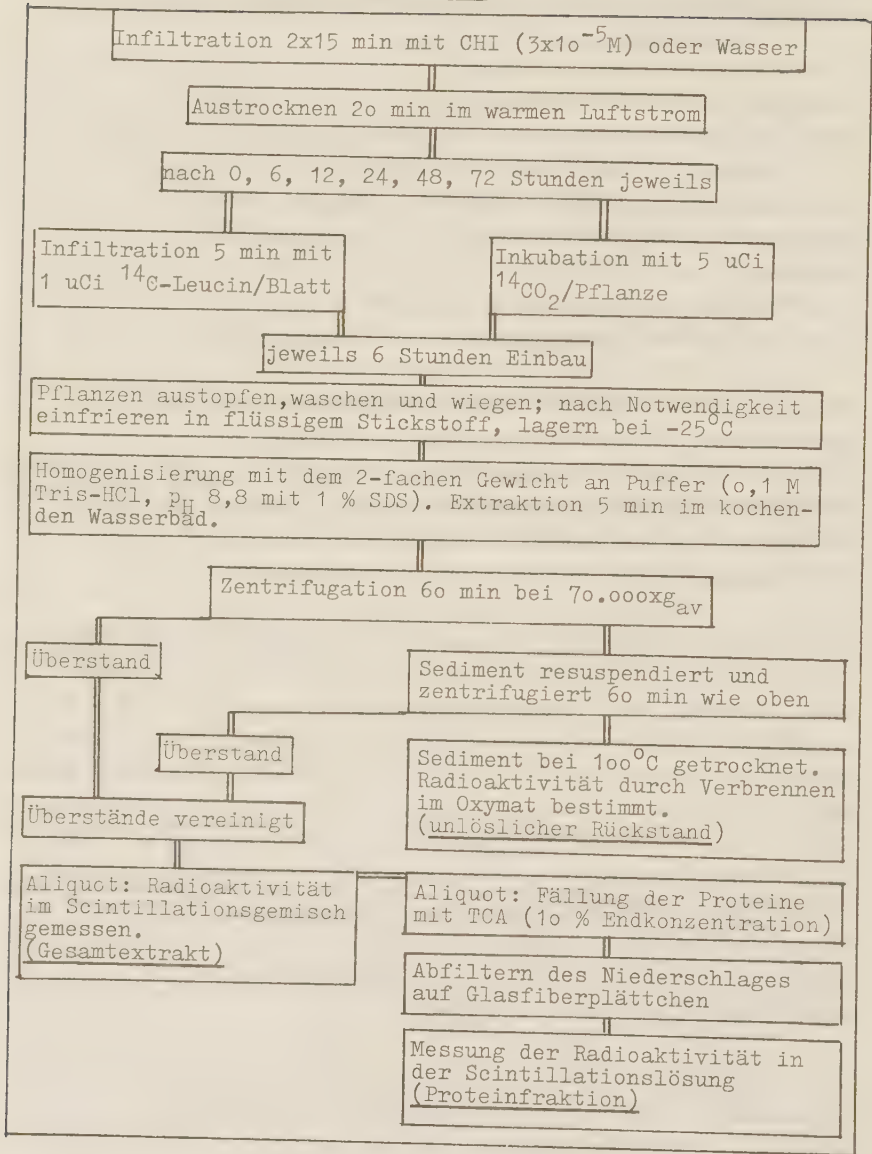
Nachdem gezeigt werden konnte, daß CHI die Gesamtfixierung von $^{14}\text{CO}_2$ nicht hemmt, sollte im folgenden der Gehalt an ^{14}C in den Proteinen nach Einwirkung von CHI untersucht werden; durch Gegenüberstellung einer externen "Fütterung" mit radioaktiv markiertem Leucin und einer internen mit in vivo synthetisierten markierten Aminosäuren sollte es gelingen, eine Wirkung von CHI auf den Transportmechanismus von der Wirkung auf die Proteinsynthese zu unterscheiden.

Wie im vorhergehenden Versuch wurden die Versuchspflanzen verschiedene Zeit nach Infiltration von CHI bzw. Wasser mit $^{14}\text{CO}_2$ oder ^{14}C -Leucin radioaktiv markiert (Methode siehe bei Abschnitt 3.2.1.1.1. und 5.1.1.1.). Die Herstellung des Gesamtextraktes und der Proteinfraction, definiert als TCA-fällbares Material ist in Abb. 17 dargestellt.

Bei Applikation von $^{14}\text{CO}_2$ war der Anteil der Proteinfraction 3 bis 10 % der im Gesamtextrakt enthaltenen Radioaktivität. Nach Fütterung mit ^{14}C -Leucin wurden 10 bis 60 % der angebotenen Aminosäure im TCA-Niederschlag gefunden. Dieser Unterschied ergibt sich daraus, daß die von außen zugesetzte Aminosäure spezifisch und nach längerer Einbauzeit auch vollständig in die Proteine eingebaut wird, währenddessen bei $^{14}\text{CO}_2$ -Markierung der radioaktive Kohlenstoff in praktisch allen neusynthetisierten Verbindungen erscheint. Zur Veranschaulichung der Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Fraktionen nach Markierung mit radioaktivem Leucin bzw. CO_2 soll die Gesamtbilanz (Tab. 14) dienen.

Die unspezifische Markierung nach Inkubation mit $^{14}\text{CO}_2$ machte es notwendig, die Proteineigenschaft des TCA-gefällten Materials zu überprüfen. Es wäre nämlich denkbar, daß nach Zusatz von TCA zum Gesamtextrakt neben den Proteinen noch andere markierte Verbindungen ausgefällt werden, die einen Einbau ins Protein vortäuschen. Daher wurde in einigen Versuchen eine Vorreinigung des Rohextraktes durch Umfällung mit Ammonium-

Abb. 17: Aufarbeitungsschema



sulfat durchgeführt. Ein Vergleich der Radioaktivität im TCA-Niederschlag des ungereinigten und des durch Umfällung vorgereinigten Extraktes zeigte in beiden Fällen nur einen Unterschied von 5 %, der sowohl auf eine Verunreinigung der Proteinfraktion wie auch auf einen Verlust bei der Umfällung zurückzuführen sein könnte. Somit kann gesagt werden, daß der TCA-Niederschlag zu indestens 95 % aus Protein besteht.

Tab. 14:

Radioaktivitätsverteilung in den nach Extraktion eines Blattes erhaltenen Fraktionen. Die Markierung erfolgte mit 1 uCi ^{14}C -Leucin bzw 5 uCi $^{14}\text{CO}_2$ unmittelbar nach Infiltration mit Wasser. Einbauzeit: 6 Stunden.

Fraktion	Einbau nach Markierung mit			
	^{14}C -Leucin		$^{14}\text{CO}_2$	
	dpm	%	dpm	%
Gesamtextrakt	2.065.366	94,5	9.755.194	89,9
unlöslicher Rückstand	120.134	5,5	1.090.406	10,1
Gesamteinbau	2.185.500	100	10.845.600	100
Proteinfraktion	1.183.166	54,1	742.926	6,9

In Abbildung 18 ist nun in einer Kinetik die in der Proteinfraktion enthaltene Radioaktivität nach verschieden langer Behandlung der Blätter mit CHI aufgetragen. Die Radioaktivität ist als prozentualer Einbau von ^{14}C im Vergleich zur Kontrolle, die lediglich mit Wasser infiltriert war, angegeben. Wie die Abbildung zeigt, ist bei simultaner Gabe von CHI und ^{14}C -Leucin bzw. $^{14}\text{CO}_2$ die in der Proteinfraktion gemessene Radioaktivität im Vergleich zur Wasserkontrolle auf 34 % bzw. 35 % reduziert. Da dieser Wert für beide Markierungswege in gleicher Weise gilt, kann angenommen werden, daß es sich hierbei um eine Hemmung der de-novo Synthese von Proteinen handelt. Betrachtet man in der Kinetik den 6-Stunden Wert, so zeigt sich, daß die Radioaktivität bei Markierung mit Leucin auf 15 % abnimmt, während sie bei $^{14}\text{CO}_2$ -Mar-

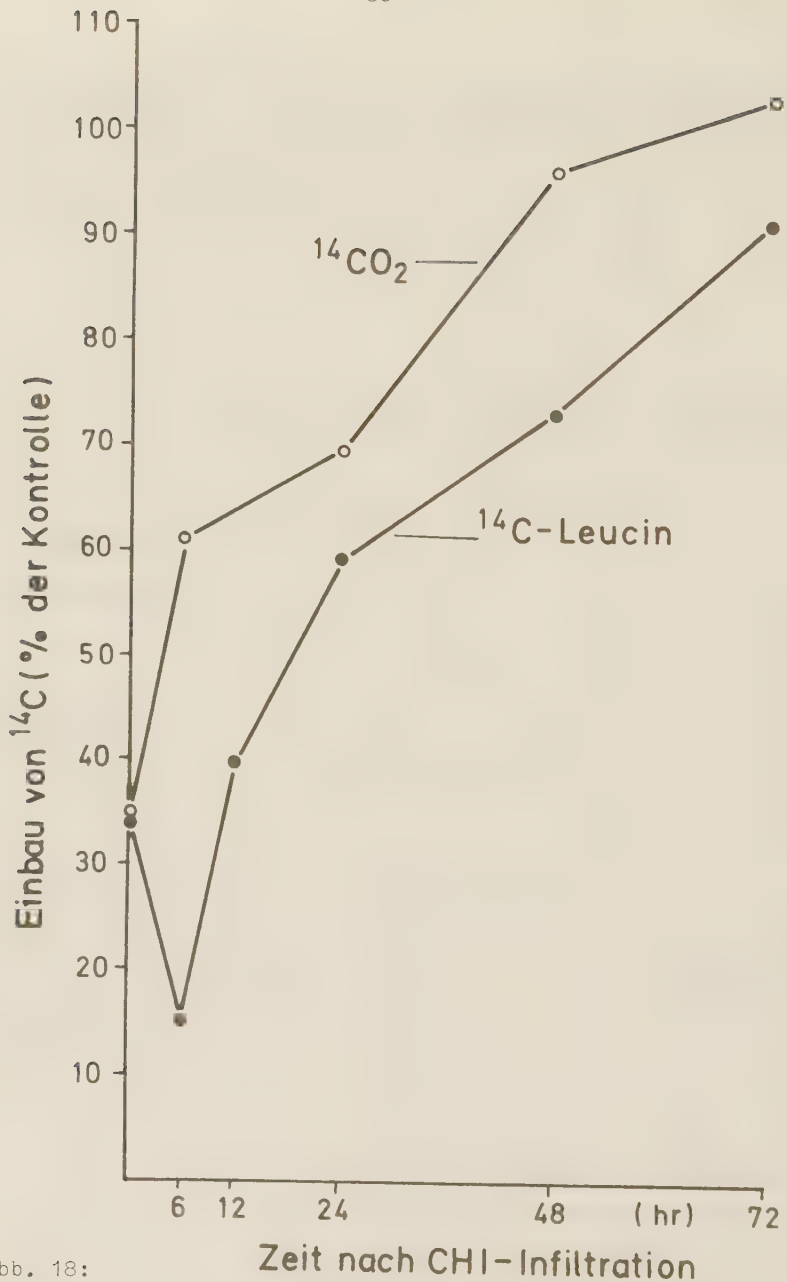


Abb. 18:

Einbau von $^{14}\text{C}\text{-Leucin}$ und $^{14}\text{CO}_2$ in die Proteinfraction verschiedene Zeit nach Einwirken von CHI (3×10^{-5} M). Der Einbau ist angegeben in Prozent der wasserinfiltrierten Kontrolle.

kierung bereits auf 61 % zunimmt. Dieser Knick macht deutlich, daß nach 6 Stunden Einwirkzeit von CHI die Aufnahme der Aminosäure stark reduziert ist, und zwar verglichen mit dem CO_2 -Wert um etwa 75 %. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von WILDES et al., (1976) überein; sie fanden, daß CHI innerhalb der ersten 2 Stunden den Einbau von Leucin in die Proteine von Gerstenwurzeln auf 46 % reduziert, ohne die Aufnahme zu beeinflussen. Nach 4 bis 5 Stunden fanden sie dann auch eine Hemmung der Aufnahme. Betrachtet man den weiteren Verlauf der Kinetik, so sieht man, daß die beiden Kurven für Leucin und CO_2 etwa parallel verlaufen, wobei eine deutliche Abnahme des Hemmeffektes erkennbar ist, so daß nach 72 Stunden Einwirkzeit von CHI der Kontrollwert fast erreicht (Leucin) oder sogar leicht überschritten wird (CO_2).

Fasst man nun die Ergebnisse zusammen, so kann daraus geschlossen werden, daß CHI in der verwendeten Konzentration und Versuchsdurchführung die Proteinsynthese nur innerhalb der ersten 6 Stunden unvollständig hemmt. Daneben führt CHI zu einer starken Beeinträchtigung der Aufnahme oder des Transports von Leucin, wobei das Maximum der Wirkung etwa 6 Stunden nach Infiltration erreicht wird.

8. Diskussion

Der photoperiodische Induktionsvorgang, welcher zur Umdifferenzierung des Vegetationspunktes und der Anlage von Blüten führt, läßt sich in vier Teilvorgänge gliedern: Absorption des Lichts im entsprechenden Photorezeptor und damit verbundene Zeitmessung, Synthese des "Blühhormons", Transport des Blühstimulus vom Blatt zum Vegetationspunkt und schließlich die morphogenetischen Vorgänge im Apikalmeristem. Die nunmehr jahrzehntelangen Forschungen über das Gebiet lassen erkennen, daß diese Teilprozesse in einer intensiven Wechselwirkung stehen und daß deshalb eine so scharfe Trennung wohl nur gedanklich möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Beitrag zur Aufklärung derjenigen Vorgänge zu leisten, die ausschließlich im Blatt ablaufen; der physiologische Indikator mußte vielfach aber doch der Vegetationspunkt, also die Anlage von Blüten sein.

Wendet man sich zunächst dem Fragenkomplex zu, der sich mit der Natur des "Blühhormons" beschäftigt, so konnte eindeutig gezeigt werden, daß die Salicylsäure, deren Rolle bei der Blütenbildung mehrfach diskutiert wurde, bei H.n. in einem weiten Konzentrationsbereich keine blühinduzierende Wirkung hat. Das gleiche gilt für Auxin und Kinetin; für das letztere nehmen z.B. BERNIER et al., (1975) an, daß es ein Bestandteil des "Blühhormon-Komplexes" ist. Die vorliegenden negativen Ergebnisse (Tab. 10) sprechen gegen eine

spezifische Beteiligung von Auxin und Kinetin an der Induktion der Blütenbildung. Ganz anders ist die Lage beim Gibberellin; die Befunde beweisen, daß die Gibberellinsäure keinen unwesentlichen Anteil am Induktionsvorgang hat. Obwohl sie ihre Wirkung wesentlich und quantitativ abhängig auf den Streckungsvorgang ausübt, induziert sie auch - bereits bei niedriger Konzentration - Blütenbildung. Allerdings ist die Blütrate dabei auf 45 % beschränkt und auch bei weit höheren Gibberellindosen nicht weiter zu steigern. Das heißt also, daß zwar der Streckungsvorgang unmittelbar auf die Gibberellinmenge reagiert, für die Blütenbildung aber ein zusätzlicher Mechanismus gefordert werden muß. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß Gibberellin am Vegetationspunkt gleichsam als "schlechtes Blühhormon" wirkt, denn auch dann wäre anzunehmen, daß bei ausreichend hoher Gibberellinmenge - der applizierte Bereich ging von 0,4 bis 200 µg pro Pflanze - auch eine zunehmende Blühantwort erfolgen würde. Diese Ansicht wird auch dadurch unterstützt, daß eine Hemmung der endogenen Gibberellinsynthese mit AMO 1618 und CCC lediglich die Sproßstreckung, nicht jedoch die Blütenbildung verhindert (CLELAND und ZEEVART, 1970). Nachdem also Gibberellin am Vegetationspunkt nicht limitierend ist, muß angenommen werden, daß Gibberellin seinerseits die Synthese des Blühhormons stimuliert und dieses nur in geringer Menge zum Apikalmeristem gelangt. Nach dem, was wir bislang wissen, ist diese Möglichkeit nicht unwahrscheinlich. Nimmt man an, daß Gibberellin im Blatt die Synthese des Blühhormons stimuliert und daß die Syntheserate von der Gibberellinmenge im Blatt abhängig ist, dann wäre ausreichend Stimulus im Blatt vorhanden, um die Blütenbildung am Vegetationspunkt auszulösen. Wie in den folgenden Abschnitten diskutiert wird, wäre aber trotz ausreichender Hormonmenge die Translokation zum Vegetationspunkt im Kurztag gehemmt, so daß nicht die optimale Hormonmenge die Spitzenregion erreicht. Erst in Verbindung mit Assimilaten, extern oder via Photosynthese bereitgestellt und verminderter Membranwiderstände (Phytochrom) würde der Abtransport des Stimulus die für eine vollständige Induktion erforderliche Menge erreichen. Hierbei ist es erwähnenswert,

daß JONES und STODDART (1973) einen Einfluß der Photoperiode auf den Transport von Gibberellin fanden. Eine Übertragung von Rotkleepflanzen aus dem Kurztag in den Langtag förderte den Export von Gibberellin aus dem jüngsten Blatt zum Apikalmeristem. An Abschnitten etiolierter Erbsenstengel konnte MERTZ (1975) zeigen, daß nach 15 Minuten Hellrot eine verstärkte Gibberellinaufnahme erfolgte. Er folgerte daraus, daß die Zelloberfläche phytochrom-kontrollierte Bindungsstellen für Gibberellin besitzt.

Es mag nun der Einwand gebracht werden, weshalb durch Kurztag gerade der Transport des Stimulus, nicht aber der von Gibberellin gehemmt wird, denn wir konnten ja eine von der zugeführten Menge an Gibberellin abhängige Sproßstreckung beobachten (Abb. 9). Der Einwand läßt sich teilweise entkräften, wenn man für Gibberellin und Blühstimulus verschiedene Transportsysteme annimmt, wie es CHAILAKHYAN und KHLOPENKOVA (1973) fanden. Nach ihren Ergebnissen wird Gibberellin im Xylem und Phloem, das Hormon dagegen nur im Phloem transportiert. Dieser Befund wird von KING und ZEEVART (1973) unterstützt; durch radioaktive Markierung des Assimilatstroms konnten sie zeigen, daß der Blühstimulus parallel mit den Assimilaten wandert. Demnach wäre es also denkbar, daß eine geringe Assimilatleitung, wie sie in der Dunkelheit oder bei geringer Belichtung erfolgt, spezifisch den Transport des Stimulus, nicht aber des Gibberellins betrifft. Wenn auch keine direkten Beweise dafür erhalten werden können, so scheint die Annahme dennoch nicht unwahrscheinlich, daß Gibberellin ein Stimulator für die Blühhormonsynthese ist, die zur Entfaltung ihrer differenzierenden Wirkung am Vegetationspunkt ein durch Photosynthese und Phytochrom kontrolliertes Transportsystem verlangt.

Die Frage nach dem Pigmentsystem, welches die Photoreaktion vermittelt, wurde bereits vor mehr als dreißig Jahren von BORTHWICK, HENDRICKS und PARKER (1946, 1950) aufgegriffen. Sie fanden, daß eine relativ kurze Belichtung in der Mitte einer langen Nacht das Blühen bei KTP verhinderte und bei

LTP förderte. Aus den erarbeiteten Wirkungsspektren, wonach Hellrot am wirksamsten induzierte und nachfolgendes Dunkelrot revertierte, wurde auf das Phytochromsystem als das kontrollierende Pigment der Blühinduktion geschlossen (DOWNS, 1956). Unter diesen Bedingungen hemmte ein Störlichtimpuls von wenigen Minuten die Blütenbildung der KTP Xanthium und Glycine völlig, dagegen wurde die LTP Hyoscyamus nur induziert, wenn die Hauptlichtperiode 11 1/2 bis 12 Stunden betrug, also knapp an der kritischen Tageslänge lag. Wie wir aber zeigen konnten (Tab. 5), führt eine Verlängerung der täglichen Lichtzeit, trotz der qualitativen Reaktion von Hyoscyamus, zu einer quantitativen Förderung der Blütrate.

In späteren Veröffentlichungen mußten die Autoren daher einräumen (SCHNEIDER, BORTHWICK und HENDRICKS, 1967), daß die Wirksamkeit von kurzem Hellrot- Störlicht generell nur für KTP gilt, und LTP oft weniger empfindlich sind. In Verbindung mit einer Hauptlichtperiode von 8 Stunden war Störlicht von 15 bis 30 Minuten an Hyoscyamus noch völlig unwirksam (LANE et al., 1965). Erst 1 bis 2 Stunden Störlicht in der Mitte der Dunkelperiode konnten die Blütenbildung fördern, wobei aber noch keine Sättigung der Reaktion auftrat (VINCE, 1965).

Eine ähnlich drastische Abhängigkeit der Wirkung fanden wir nun bei den Störlichtversuchen. Wie Tab. 3 zeigt, ist die Blütenbildung von der Dauer des Störlichts abhängig. Bei Belichtungszeiten von 0,5 bis 64 min gelingt es nur mit der längsten Belichtungszeit bzw. höchsten Gesamtenergie Blütenbildung auszulösen. Dieser Energiebetrag stimmt gut mit den Angaben von STOLWIJK (1955) und WASSINK (1958) überein. Obwohl dieses Störlicht durch anschließendes Dunkelrot zumindest teilweise revertierbar war (Tab. 4) und deshalb für die NER spricht, stellt der hohe Energiebetrag von ca. 30.000 kerg/cm² dies wiederum in Frage. Allerdings darf dabei nicht übersehen werden, daß bei grünen Pflanzen durch den Beschattungseffekt des Chlorophylls keine Aussagen darüber möglich sind, welcher Teil des eingestrahlten Hellrot-Lichts zur Bildung des aktiven Phytochroms wirksam wird. Allein

schon aus diesem Grund können die an etioliierten Pflanzen erarbeiteten Befunde über die Einstellung eines photostationären Gleichgewichts bei Bestrahlung mit bestimmten Spektralbereichen nur mit größter Vorsicht auf grüne Pflanzen übertragen werden. Offenbar ist eine bestimmte Menge an P_{fr} zur Auslösung der Blühantwort nötig, die wegen der Beschattung durch Chlorophyll nur bei höheren Dosen von Hellrot erreicht wird; dementsprechend ist dabei Dunkelrot und Blau unwirksam (Tab. 4). Sofern eine Mindestbestrahlungsstärke von $3,5 \text{ kerg/cm}^2\text{sec}$ für Hellrot-Störlicht verwendet wird, erfolgt die Blühantwort quantitativ in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke, der Bestrahlungsdauer und der Zahl der Störlichtzyklen (Abb. 5 und 6). Es wäre also einleuchtend, daß erst hohe Hellrot-Intensitäten die Phototransformation ermöglichen, wenn nicht die Verhältnisse bei KTP identisch wären. Für die geringere Empfindlichkeit von LTP auf Störlichtimpulse müssen also noch andere Faktoren verantwortlich sein.

Von der unter Kurzzeitbelichtung ablaufenden, Hellrot-Dunkelrot reversiblen NER wird die HER unterschieden, bei der Dunkelrot und Blau die wirksamen Spektralfarben sind. Trotz dieses anderen Wirkungsspektrums läßt sich auch diese Reaktion - zumindest im Dunkelrot - dem Phytochrom zuschreiben (HARTMANN, 1966). Der Grund dafür ist, daß bei Langzeitbelichtung mit Hellrot zunächst auch das photostationäre Gleichgewicht von $P_{fr}/P_r = 0,8$ eingestellt wird, aber die Gesamtmenge an Phytochrom durch Photodestruktion des P_{fr} rasch abnimmt, wenn der pool an P_r erschöpft ist. Dadurch ist es möglich, daß im Dauer-Dunkelrot trotz des niedrigeren Gleichgewichts von $P_{fr}/P_{tot} = 0,05$ nach mehreren Stunden eine höhere Konzentration an P_{fr} vorhanden ist als im hellroten Licht, da hierbei keine Destruktion erfolgt (WAGNER und MOHR, 1966).

Versuche mit verschieden farbigem Zusatzlicht haben eindeutig bewiesen, daß die bei etioliierten Pflanzen gefundene Blau-Dunkelrot-Wirksamkeit und gleichzeitige Unwirksamkeit von

Hellrot nicht bei der Blütenbildung grüner Pflanzen auftritt. Wie Abb. 7 zeigt, sind Blau und Dunkelrot, wie auch Hellrot in gleichem Umfang befähigt, als Zusatzlicht über 14 Stunden Blüten zu induzieren. Dies widerspricht klar der Aussage von VINCE (1972), wonach "... LDP do not flower or flower more slowly, if the long photoperiods do not contain farred light."

Allerdings bestehen über die Destruktionskinetik von P_{fr} in vivo erhebliche Meinungsverschiedenheiten. Während SCHOPFER (1973) für P_{fr} eine Halbwertszeit von 45 min angibt, bleibt nach den Messungen von KING (1972) an *Chenopodium* das P_{fr} nach 5 min Hellrot noch 3 Stunden lang erhalten und sinkt erst dann ab. CLARKSON und HILLMAN (1968) benützten *Pisum* für ihre Versuche; sie fanden eine ähnliche Halbwertszeit (45 % pro Stunde), berichten aber, daß nach 4 Stunden die Destruktion ins Gleichgewicht kommt und ein konstanter Wert an P_{fr} erhalten bleibt. Dagegen konnten MIYOSHI et al. (1974) bei einer Belichtung von nur 30 min Hellrot nach weiteren 8 Stunden Dunkelheit kein P_{fr} mehr messen. Es ist auch keineswegs so, daß eine Erhöhung der Bestrahlungsstärke die Photo-destruktion beschleunigt, denn KENDRICK und SPRUIT (1972) fanden bei hohen Lichtintensitäten eine Anhäufung von Zwischenprodukten, die den weiteren Abbau von Phytochrom verlangsamen sollen. Aus diesen Befunden folgt, daß bei der Diskussion von Phytochromreaktionen bei etiolierten und grünen Pflanzen nicht nur die Chlorophyllbeschattung bei letzteren in Betracht gezogen werden muß, sondern auch Unterschiede in der Stabilität des P_{fr} , wie sie sich aus den Destruktionskinetiken ergeben.

Wie kann man sich nun vorstellen, daß der Photorezeptor - nach den vorliegenden Befunden also vermutlich das Phytochromsystem - die Folgereaktionen auslöst, die zur Blütenbildung führen? Die Frage ist, ob Phytochrom die Synthese des hypothetischen Blühhormons unmittelbar durch einen Schaltermechanismus auslöst, oder etwa nur quantitativ reguliert. Durch Kombination subkritischer Tageslängen mit Infiltration von CHI konnten wir zeigen (Abb. 16), daß bereits im Kurz-

tag blühhfördernde Prozesse ablaufen. Aus diesen und den Störlichtversuchen, in denen verschiedene Belichtungszeiten- und -intensitäten kombiniert wurden (Abb. 5 und 6), gelangt man eher zu der zweiten Ansicht. Die quantitative, akkumulative Blühantwort, wie sie sich als Folge addierter, suboptimaler Induktionsstöße ergibt, läßt es wahrscheinlich erscheinen, daß entweder die Produktion des Stimulus oder dessen Translokation durch P_{fr} gesteuert wird. Während eine Regulation der Hormonproduktion durch P_{fr} - sie müßte auf der Ebene der Aktivitätskontrolle der synthetisierenden Enzyme erfolgen - durch keine Befunde gesichert ist, gibt es für eine Kontrolle des Hormontransports vielfältige Hinweise. So haben sich Indizien ergeben, daß eine frühe Antwort der Phototransformation von P_r in P_{fr} eine Veränderung der funktionellen Eigenschaften der Membranen beinhaltet (HENDRICKS und BORTHWICK, 1967). Unter anderem führt die Phytochromumsteuerung in der Pflanze zu Permeabilitätsveränderungen an Plasmamembranen. Durch die Änderung der Permeabilitätsverhältnisse könnte erst der Transport des Blühhormons zum Vegetationskegel ermöglicht werden (KANDELER, 1972). Als Ausdruck derartiger phytochromvermittelter Membranänderungen konnten GREPPIN und HORWITZ (1975) bioelektrische Potentialänderungen an Salatblättern messen, die nach Hellrot- oder Dunkelrotbelichtung auftraten. Dieser Befund ist für die Blütenbildung von besonderem Interesse, weil die Autoren nicht nur einen täglichen Rhythmus der bioelektrischen Antwort beobachteten, sondern auch eine Abhängigkeit von Kurztag- oder Langtagbedingungen. So fanden sie nach Langtag eine hohe bioelektrische Reaktion, die auch nach Rückkehr in den Kurztag nicht revertiert wurde. Diese irreversible Langtagantwort, die gleichsam als induzierter Zustand bezeichnet werden kann, scheint in Beziehung mit der Blütenbildung beim Spinat zu stehen.

Die beschriebenen Membranwirkungen des Phytochroms werden verständlicher, wenn man an die Lokalisation des Phytochroms in den Membranen denkt. Nachdem MUMFORD und JENNER (1966) zumindest eine Assoziation des Phytochroms an spezifische Membranen

aufgrund des Anteils nichtpolarer Reste des Chromoproteins annahmen, entdeckten COOKE und KENDRICK (1976) Phytochrom in den isolierten Hüllmembranen von Avena-Etioblasten, während in den anderen Fraktionen kein Phytochrom enthalten war. Dieser Befund wurde für Gerste von EVANS und SMITH (1976) bestätigt. Damit im Einklang stehen auch die Berichte von HAMPP und SCHMIDT (1977), in denen sie zeigen, daß Phytochrom die Eigenschaften transportlimitierender Membranen von Mitochondrien und Plastiden kontrolliert. Nach Inkubation mit δ -Amino-laevulinat und Succinat zeigten beide isolierten Organelle eine starke Zunahme der intraorganellen Konzentration, wenn sie mit Dauer-Dunkelrot oder Hellrot vorbestrahlt wurden.

Die bisher erörterten Befunde reichen jedoch nicht aus, um sämtliche Phänomene bei der Lichtinduktion der Blütenbildung zu erklären. Offene Fragen sind die unvollständige Revertierbarkeit des Hellrot-Störlichts, der CO_2 -Bedarf von Hellrot-Störlicht sowie vor allem die Tatsache, daß keine der Farblichtbedingungen bereits nach 2 Tagen einen Induktionseffekt erzielt wie weißes Licht hoher Intensität. Das Ergebnis des Dauerlichtversuchs, in dem Beleuchtungsstärken von 50 Lux bis 5000 Lux für 2 bis 4 Tage gegeben wurde, erbrachte eine Abhängigkeit der Blütrate von der jeweiligen Beleuchtungsstärke- und -dauer, wie es auch bei den Störlichtversuchen gefunden wurde (Abb. 4, 5, 6). Faßt man diese Ergebnisse zusammen, so wird den Hypothesen Nahrung gegeben, wonach auch die Photosynthese entscheidend an der Induktion beteiligt ist.

Noch vor der Entdeckung des Phytochroms wurde eine Beteiligung des dissimilatorischen Stoffwechsels bei der photoperiodischen Reaktion diskutiert. So konnte durch Zuckerinfiltration Blütenbildung bei Hyoscyamus im Kurztag ausgelöst werden. In gleicher Weise gelang eine Induktion, wenn die Atmung in der Nacht durch Stickstoff unterbunden wurde (CLAES, 1947). Ebenso fanden LIVERMAN und BONNER (1953), daß die einer Dunkelperiode obligat vorausgehende Lichtphase von hoher

Intensität sein muß, aber auch durch Saccharose oder andere Zucker ersetzt werden kann. Auch SCHNEIDER et al. (1967) hatten Schwierigkeiten, die Reaktion von H.n. auf Rotlicht mit dem Phytochrom allein zu erklären. Sie fanden, übereinstimmend mit unseren Versuchen, daß die Länge der Photoperiode ganz wesentlich für den Erfolg der Experimente war. Sie kamen zu der Folgerung, daß die Hellrot-Antwort nicht durch die Phytochrom-Umwandlung allein vermittelt werden kann, sondern vielleicht die Photosynthesesysteme erst die Phytochromreaktion ermöglichen. Allerdings kann dies nicht generell gefordert werden, denn die HER läuft auch in etiolierten Pflanzen mit nur wenig organisiertem Photosyntheseparat ab (BERTSCH und MOHR, 1965).

Trotz aller bestehender Widersprüche kommt man nicht umhin, der Photosynthese beim Induktionsvorgang eine gewisse Beteiligung zuzuschreiben. Wie der Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ unter den verschiedenen Lichtqualitäten ergab, besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Netto- CO_2 -Fixierung und dem Blüherfolg (Tab. 6). Auch der Befund, daß unter CO_2 -freien Bedingungen während der Hellrot-Störlichtphase der Blüherfolg drastisch reduziert wurde (Tab. 7), fügt sich nicht in das Bild einer rein photochemischen Reaktion. Weiterhin gibt es zahlreiche Befunde, wonach der Hemmstoff des Elektronentransports der Photosynthese (DCMU) in phytochromvermittelte Antworten eingreift. Bei der Untersuchung der Anthocyansynthese in der Apfelhaut kamen DOWNS et al. (1965) zu der Folgerung, daß das Photosynthesesystem der Photorezeptor der HER sei, denn DCMU hemmte die Anthocyansynthese in gleichem Umfang wie die Entwicklung von Sauerstoff. Von den weiteren Befunden sei noch KIRKLAND et al. (1974) aufgeführt, die berichten, daß hellrotes Störlicht sowohl mit Dunkelrot, als auch mit DCMU revertierbar war. Besonders interessant ist an diesem Punkt der Diskussion, daß die bereits erwähnten Hellrot-Dunkelrot reversiblen Potentialschwankungen ebenfalls mit DCMU verhindert werden konnten (GREPPIN und HORWITZ, 1975).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß für eine optimale photoperiodische Reaktion die Photosynthese unbedingt notwendig ist. Ob ihre Rolle bei der Synthese oder beim Transport des Blühstimulus zu suchen ist, kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht entschieden werden.

Der nächste Fragenkomplex, mit dessen Untersuchung sich diese Arbeit befasste, war die in gewisser Weise widersprüchliche Wirkung des Hemmstoffes der Proteinbiosynthese CHI. Es ist aus der Literatur bekannt, daß CHI ein potenter Inhibitor der Blütenbildung ist, sofern es auf den Vegetationspunkt aufgetragen wird (Zus.fassung BERNIER, 1970). Dieser, auch von uns bestätigte Befund ist durchaus einleuchtend, wenn man annimmt, daß die Umgestaltung des Apikalmeristems von der Blattproduktion zur Anlage generativer Organe von einer Umsteuerung der Biosynthesewege durch differentielle Genaktivierung begleitet ist (MOHR, 1966).

Während also eine Hemmung der Blütenbildung durch Applikation von Hemmstoffen der Transskription und Translation auf den Vegetationspunkt, also den Ort der morphogenetischen Umsteuerung sehr stark für eine Beteiligung von de-novo Synthesen spricht, ist die blühinduzierende Wirkung von 2-TU (EICHHOFF und RAU, 1969) und CHI (KLAUTKE und RAU, 1973) nach Infiltration in die Blätter nicht auf diese Weise verständlich. Zwei Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an: Zum einen könnte die Synthese eines "Blühhemmstoffes", wie er von DENFFER (1950) diskutiert wurde, blockiert werden. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch nicht nur die Pfropfungsversuche (Zus.fassung LANG, 1965), sondern auch die Befunde von EICHHOFF und RAU, 1969 und KLAUTKE und RAU (1973), daß bei Infiltration von nur 3 von 6 belassenen Blättern mit 2-TU oder CHI der Induktionseffekt nicht verringert wurde. Für die Induktionswirkung ist daher eine zweite Möglichkeit zu diskutieren, wonach die beiden Substanzen keine direkte Hemmung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese ausüben, sondern in erster Linie eine Transporthemmung bewirken. Dafür gibt es für CHI vielfältige Hinweise: Das von WHIFFEN (1948) beschriebene Antibiotikum

CHI kann nach zahlreichen Experimenten durchaus als Hemmstoff der Proteinsynthese gelten, jedoch scheinen die Nebeneffekte zu Widersprüchen zu führen. Diese gehen soweit, daß MAHON (1975) schreibt: "CHI is not a specific inhibitor of protein synthesis in vivo". MC DONALD und ELLIS (1969) deuteten erstmals an, daß CHI bei höheren Pflanzen über andere Wege den Stoffwechsel unterbrechen kann; eine Hemmung des Transportmechanismus wurde vielfach beobachtet und diskutiert (ELLIS und MC DONALD, 1970; EVANS 1971; HUNTNER et al., 1973; LÄUCHLI et al., 1973; TIMBERLAKE 1973; PARTHIER 1974; KELDAY und BOWLING, 1975; WILDES et al., 1976). Eine Hemmung des Transport- und Aufnahmeporganges kann allerdings eine Hemmung der Proteinneusynthese vortäuschen, wenn diese am Einbau einer von außen angebotenen markierten Aminosäure gemessen wird, wie es vielfach der methodische Weg ist.

Die Versuche über den Einbau von außen zugeführten ^{14}C -Leucins bzw. von $^{14}\text{CO}_2$ in die Blattproteine nach vorheriger Infiltration des Blattes mit einer CHI-Konzentration, die für die Auslösung der Blütenbildung optimal ist, haben nun eindeutig gezeigt, daß CHI im Blatt von H.n. vor allem die Aufnahme von Leucin hemmt, die Proteinsynthese selbst dagegen nur in den ersten Stunden nach Infiltration deutlich (Abb. 18). Das Ergebnis, daß CHI vor allem Transportvorgänge hemmt, steht in Übereinstimmung mit den eben zitierten Befunden anderer Autoren.

Die unvollständige Hemmung der Proteinsynthese, wie sie im Zusammenhang mit der Blühinduktion auch KLAUTKE und RAU (1974) fanden, läßt es sehr unwahrscheinlich erscheinen, daß diese die Ursache der Induktion ist. Wie könnte aber dann die blüh-induzierende Wirkung von CHI erklärt werden? Wir ziehen aus den Ergebnissen den folgenden Schluß: CHI hemmt im Blatt für einige Zeit den Abtransport des Stimulus, nicht aber seine Synthese; daß der Inhibitor den Stoffwechsel des Blattes nicht entscheidend beeinträchtigt, konnte durch die unbeeinflusste Netto-Fixierungsrate von CO_2 gezeigt werden (Tab. 13). Dadurch häuft sich Blühstimulus im Blatt an und nach Abklingen

der Transporthemmung kann deshalb eine Konzentration des "Blühhormons" zum Vegetationspunkt gelangen, die über der kritischen Schwelle liegt. Dies wird durch unsere Versuche gestützt, wonach die im Kurztag gebildete subkritische Menge an Blühstimulus nach Vorinfiltration mit CHI den zur Induktion notwendigen Schwellenwert erreicht (Abb. 16); in die gleiche Richtung weist die additive Wirkung unterschwelliger Dauerlichtinduktion mit CHI (KLAUTKE und RAU, 1973). Eine Transporthemmung durch CHI wird besonders durch die kombinierte Infiltration von CHI und Gibberellin deutlich gemacht; nach Infiltration von CHI wird die durch Gibberellin induzierte Sproßstreckung signifikant reduziert (Tab. 12). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist noch der weitere Nebeneffekt von CHI zu beachten, wonach es spezifisch die Synthese abbauender Enzyme hemmt. Über die bei ZENK (1970) erörterten Hinweise hinaus sind die Ergebnisse von THEIMER et al. (1976) zu sehen, wonach CHI in gleicher Weise wie Kinetin den Aktivitätsverlust der glyoxysomalen Enzymaktivitäten hemmt. Auch MARTIN und THIMANN (1970) hatten gefunden, daß CHI wie Kinetin die durch Serin beschleunigte Vergilbung von Haferblättern verhindert. Allerdings scheint CHI über einen anderen Mechanismus als Kinetin zu wirken, denn während Serin auch in Gegenwart von Kinetin bis 10 mg/l die Vergilbung erzeugt, hat es in Gegenwart von CHI keine Wirkung. Dies können wir auch für die Induktion der Blütenbildung bestätigen, denn in keinem Fall ist es uns gelungen, Blütenbildung mit Kinetin auszulösen (Tab. 10). Vielleicht könnte der Befund von BRUNOLD und SCHMIDT (1977) eine Erklärung bringen; sie beobachteten, daß nach Einwirkung von CHI über das Kulturmedium von Lemna die pool-Größen für einzelne Aminosäuren drastisch verändert wurden. Dies gilt für Serin, dessen pool sich um 75 % vergrößert und in besonderem Maß auch für Leucin, dessen Gehalt im Blattextrakt um den Faktor 10 zunimmt. Eine derartige Veränderung der pool-Größen von Aminosäuren darf nicht übersehen werden, wenn man eine Hemmung der Proteinsynthese nach CHI-Applikation beobachtet. Es ist zumindest in Betracht zu ziehen, daß eine extern gefütterte radioaktiv markierte Aminosäure nach CHI-Einwirkung beim Einbau auf eine größere "Konkurrenz" endogener

Aminosäuren trifft, wodurch sich das Verhältnis unmarkierter zu markierter Aminosäuren im neu synthetisierten Protein derart verschiebt, daß eine Hemmung der Neusynthese vorgetäuscht wird.

Nach dem aus den bisherigen Ergebnissen und Diskussionen gewonnenen Bild erscheint es wenig wahrscheinlich, daß die Synthese des hypothetischen Blühhormons erst nach Überschreiten der kritischen Tageslänge im Blatt eingeschaltet wird; vielmehr sprechen die Befunde dafür, daß auch im Kurztag eine fortwährende, wenn auch subkritische Hormonmenge synthetisiert wird. Unter diesem Aspekt wäre es dann nicht verwunderlich, daß im Proteinmuster der Blätter nach Induktion keine Veränderungen gefunden wurden. Zwar konnten spezifische Proteinbanden, die im Zusammenhang mit der Blüteninduktion stehen, im Apikalmeristem nachgewiesen werden (JACQUARD et al., 1975), jedoch gibt es nur schwache (METZNER, 1955; JINDAL et al., 1976; SAWHNEY, 1976) oder negative Befunde (SHERWOOD et al., 1971) für eine de-novo Synthese spezifischer Proteine oder Nukleinsäuren im induzierten Blatt. Es ist zwar der Einwand nicht von der Hand zu weisen, daß die Auftrennungsmethode nach wie vor zu ungenau ist, um die eventuell minimale Veränderung des Proteinmusters nach photoperiodischer Induktion nachzuweisen, jedoch kann gesagt werden, daß die fundamentale Umsteuerung des Vegetationspunktes nicht von einer deutlichen Neusynthese der löslichen Blattproteine begleitet wird. Dies steht im Einklang mit den Befunden von SHERWOOD et al. (1971), welche die Proteine von Xanthiumpflanzen vor und nach Induktion durch Gelelektrophorese auftrennten. Sie konnten dabei weder in der Bandenzahl noch im ^{14}C -Einbau qualitative Unterschiede finden, die auf eine de-novo Synthese hinwiesen und stellten deshalb abschließend fest: "... that phytochrome initiates the release of a flowering hormone, in which case no induction of enzymes in cocklebur leaves need be postulated." In der Abbildung 19 ist ein möglicher Zusammenhang der einzelnen Reaktionen dargestellt. Er geht davon aus, daß die Synthese und der Transport des auch unter nichtinduktiven Bedingungen gebildeten Blühstimulus quantitativ durch die ver-

schiedenen Faktoren gefördert oder gehemmt wird. Der "Schaltermechanismus" für die Blüteninduktion ist, getrennt von dem der Sproßstreckung im Apikalmeristem lokalisiert und durch die Menge des dort vorhandenen Hormons determiniert.

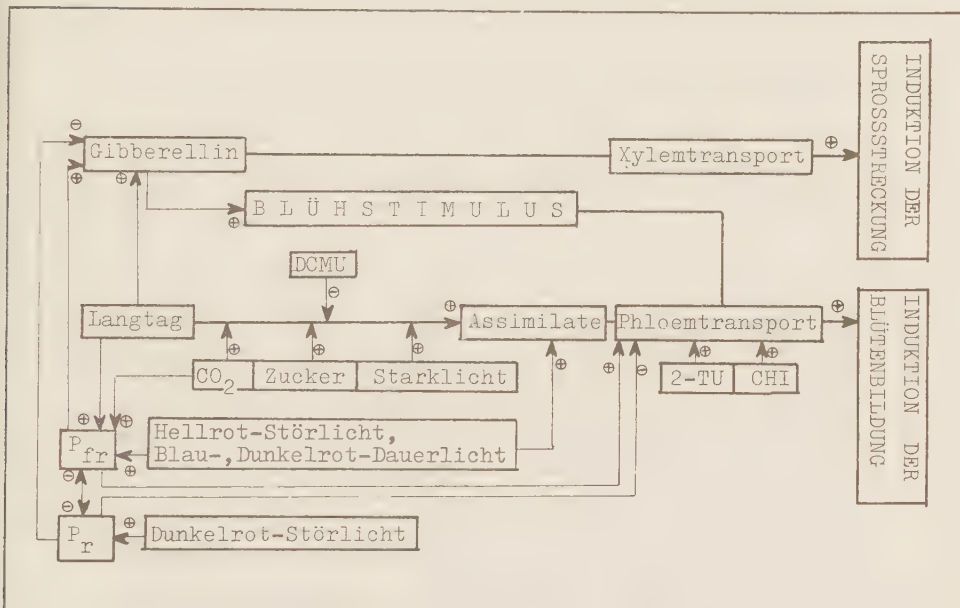


Abb. 19:

Hypothetisches Schema der Blühinduktion bei Langtagpflanzen

9. Zusammenfassung

1. Bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung wird unter dem Einfluß der entsprechenden Tageslänge in den Blättern das hypothetische "Blühhormon" gebildet, das nach Transport zum Vegetationspunkt dort den Umschlag von der Produktion vegetativer zur Bildung von generativen Organen auslöst. Die Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* ist auf Grund ihres Rosettenwuchses zur selektiven Untersuchung der Vorgänge im Blatt und im Apikalmeristem besonders geeignet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Aufklärung der im Blatt ablaufenden Reaktionen beizutragen.
2. Als "Störlicht" ist nur hellrotes Licht wirksam; die Wirkung von 45 min dauerndem Hellrot läßt sich durch nachfolgendes Dunkelrot nicht vollständig revertieren. Die Wirksamkeit von hellrotem Störlicht steht in einem quantitativen Zusammenhang mit seiner Dauer, der eingestrahlten Energie und der Zahl der Induktionszyklen; die für eine Induktion notwendige Gesamtenergie liegt sehr viel höher als bei der Verhinderung der Blütenbildung bei Kurztagpflanzen und bei der Niederenergiereaktion etiolierter Keimlinge.
3. Als Zusatzlicht zu einer Hauptlichtperiode von Weißlicht oder als Dauerlicht wirken nicht nur Blau und Dunkelrot blühinduzierend, sondern - im Gegensatz zur Hochenergiereaktion bei etiolierten Pflanzen - auch Hellrot. Keine der Farblicht-

qualitäten erreicht aber die Wirksamkeit von Weißlicht. Aus den Versuchen wird geschlossen, daß eine Trennung von Nieder- und Hochenergiereaktion wie bei der Photomorphogenese bei der Induktion der Blütenbildung nicht möglich ist.

4. Die quantitative Wirkung von subkritischen Tageslängen konnte durch die Addition mit Störlicht oder mit CHI-Infiltration sichtbar gemacht werden. Aus diesen sowie den Störlichtversuchen wird geschlossen, daß das "Blüh-hormon" ständig synthetisiert wird und nicht erst nach Überschreiten einer kritischen Tageslänge.
5. Für eine optimale Blühinduktion ist eine Lichtperiode mit hoher Intensität notwendig. Durch Messung der Netto-CO₂-Fixierung unter verschiedenen Bedingungen konnte eine Korrelation zwischen Blütrate und Fixierungsrate aufgezeigt werden. Die Photosynthese ist demnach an der Induktion der Blütenbildung beteiligt.
6. Die Frage nach der stofflichen Natur des Blühhormons ist bislang ungeklärt. Es konnte gezeigt werden, daß die von einigen Autoren als blühfördernd bezeichneten Substanzen Salicylsäure und Aspirin bei *Hyoscyamus niger* keine Blüten induzieren.
7. Unter den untersuchten Phytohormonen Auxin, Kinetin und Gibberellin löst ausschließlich letzteres Blütenbildung mit einer Blütrate bis höchstens 45 % aus. Daneben wird die Sproßachse dosisabhängig durch Gibberellin gestreckt. Da die Induktion der Blütenbildung bereits bei einer niedrigeren Gibberellinmenge erfolgt als die Sproßstreckung, scheinen die beiden Vorgänge entgegen der in der Literatur vertretenen Ansicht nicht gekoppelt zu sein.
8. Nachdem im Zusammenhang mit der Blühinduktion eine de-novo Synthese von spezifischen Enzymen diskutiert wird, wurden die Blattproteine vegetativer und induzierter

Pflanzen miteinander verglichen. Weder die Gelfiltration der löslichen Proteine über Sephadex, noch Polyacrylamidgel-Elektrophorese der löslichen und strukturgebundenen Proteine ergab Unterschiede im Proteinmuster und der Radioaktivitätsverteilung nach Fütterung mit ^{14}C -Leucin. Dies unterstützt den aus den Blühversuchen abgeleiteten Befund, daß die Blühhormonsynthese auch bereits unter nichtinduzierenden Bedingungen abläuft.

9. Die Frage, ob die Regulation der Blütenbildung über die Aktivitätskontrolle bestimmter Enzyme erfolgt, wurde an den Enzymen NAD-GAPDH (E.C. 1.2.1.12), NADP-GAPDH (E.C. 1.2.1.13) und GPT (E.C. 2.6.1.2.) untersucht. Der Vergleich der Enzymaktivitäten unter den verschiedenen Lichtbedingungen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen induzierten und nichtinduzierten Pflanzen.
10. Die Frage, über welchen Mechanismus Cycloheximid die Blütenbildung auslöst, wurde durch Einbauversuche von ^{14}C -Leucin und $^{14}\text{CO}_2$ in die Proteine in Gegenwart von Cycloheximid untersucht. Mittels einer Einbaukinetik wurde bewiesen, daß Cycloheximid (CHI) neben einer gewissen Hemmung der Proteinsynthese hauptsächlich die Aufnahme der Aminosäure hemmt. Bei der Kombination von Gibberellin- und CHI-Infiltration ergab sich kein gegenseitiger Einfluß auf die Blütrate; dagegen wird die durch Gibberellin ausgelöste Sproßstreckung durch CHI signifikant reduziert. Aus den übrigen Befunden wird gefolgert, daß die blühinduzierende Wirkung von CHI in einer vorübergehenden Hemmung des Blühhormontransports aus dem Blatt beruht. Nach beendeter Transporthemmung (aus den erarbeiteten Daten nach 48 bis 72 Stunden) wird die bislang aufgestaute Menge an Blühstimulus zum Vegetationspunkt exportiert und überschreitet dort die zur Induktion notwendige Schwelle.

11. Es wird diskutiert, daß die blühfördernden Bedingungen primär über die Translokation des Blühstimulus und nicht über dessen Synthese wirken; die "Blühhor-mon"-Synthese selbst wird durch diese Bedingungen höchstens quantitativ modifiziert. Dazu wurde ein Schema entworfen, in welcher Weise die einzelnen Faktoren zusammenwirken könnten. Als Folge ergibt sich, daß der geforderte Schaltermechanismus bei der Induktion nicht wie vielfach angenommen, im Blatt, sondern im Vegetationspunkt lokalisiert ist.

10. Literaturverzeichnis

- Bailey, J.L. Techniques in Protein Chemistry, Elsevier, (1962)
- Bassi, P.K., E.B. Tregunna and A.N. Purohit: Plant Physiol. 56, 335-336 (1975)
- Beck, C.F. and G.J. Howlett: J. Mol. Biol. 111, 1-17 (1977)
- Bernier, G.: Cellular and molecular aspects of floral induction, London (1970)
- Bernier, G.: in "Etudes de Biologie Végétale". R. Jacques ed., Paris, pp. 243-264 (1976)
- Bernier, G., Kinet, J.M., Jacqmard, A., Bodson, M., and Havelange, A.: XII. Intern. Bot. Congr. Abstr. Leningrad (1975)
- Bertsch, W. and H. Mohr: Planta 65, 17-26 (1965)
- Balegh, S.E. and O. Biddulph: Plant Physiol. 46, 1-5 (1970)
- Bhalla, P.R. and P.S. Sabharwal: Exper. 31, 540-541 (1975)
- Bonner, W.M. and R.A. Laskey: Eur. J. Biochem. 46, 83-88 (1974)
- Borthwick, H.A., S.B. Hendricks, M.J. Schneider, R.B. Taylorson and V.K. Toole: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 479-486 (1969)

- Brinckmann, E. and U. Lüttge: Exper. 31/8, 933-935 (1974)
- Brüning, K., H. Drumm and H. Mohr: B.P.P. 168, 141-156
(1975)
- Brunold, C. and A. Schmidt: subm. to Plant Physiol. (1977)
- Bünning, E.: The physiological clock. Acad. press, N.Y. (1963)
- Bünsow, R. und R. Harder: Naturwiss. 43, 479-480 (1956)
- Chailakhyan, M.KH.: C.R.(Dokl.) Acad. Sci. USSR 3 (N.S. 12)
443-447 (1936)
- Chailakhyan, M.KH. and L. P. Khlopenkova: Fisziol. Rastenij
19, 1002-1010 (1973)
- Cherry, J.H. and R.B. van Huystee: Plant Physiol. 40, 987 (1965)
- Claes, H.: Z. Naturforsch. 26, 45-55 (1947)
- Clarkson, D.T. and W.S. Hillman: Plant Physiol. 43, 88-92 (1968)
- Cleland, C.F.: Plant Physiol. 54, 899-903 (1974)
- Cleland, C.F. and A. Ajami: Plant Physiol. 54, 904-906 (1974)
- Cleland, C.J. and J.A.D. Zeevart: Plant Physiol. 46,
392-400 (1970)
- Cocucci, M.C. and E. Mareé: Plant Sc. letters, 1, 293-301
(1973)
- Denffer, D. von: Naturwiss. 37, 297-301, 317-321 (1950)
- Downs, R.J.: Plant Physiol. 31, 279-284 (1956)
- Downs, R.J., H.W. Siegelman, W.L. Butler and S.B. Hendricks:
Nature 205, 909-910 (1965)
- Eichhoff, E. und W. Rau: Planta (Berl.) 87, 290-303 (1969)

- Ellis, R.J. and J.R. Mac Donald: Plant Physiol. 46,
227-232 (1970)
- Ennis, Y.L. and M. Lubin: Science 146, 1474 (1964)
- Evans, L.T.: Aust. J. Biol. Sci. 17, 24 (1964)
- Evans, L.T. and I.F. Wardlaw: Planta 68, 310-326 (1966)
- Evans, L.T.: The Induction of Flowering. Macmillan of
Australia (1969)
- Evans, L.T.: Ann. Rev. Plant Phys. 22, 365-394 (1971)
- Evans, E. and H. Smith: Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
73, 138-142 (1976)
- Feldman, F. and H.R. Mahler: J. Biol. Chem. 249, (12),
3702-3709 (1974)
- Foury, F. and A. Goffeau: Nature New Biol. 245, 44-47 (1973)
- Frosch, S. and E. Wagner: Can. J. Bot. 51, 1529-1535 (1973)
- Garner, W.W. and H.A. Allard: J. Agr. Res. 18, 552-607 (1920)
- Garner, W.W. and H.A. Allard: J. Agr. Res. 31, 555 (1925)
- Goodman, D. and H. Matzura: Anal. Biochem. (N.Y.) 42,
481-486 (1971)
- Greppin, H. and B. Horwitz: Z. Pflanzenphys. 75, 243-249
(1975)
- Grill, R. and D. Vince: Planta 70, 1-12 (1966)
- Grishina, G.S., S. Maleszewski, A. Frankiewicz, N.P.
Voskresenskaya and J. Poskuta: Z. Pflanzenphys.
73, 189-197 (1974)
- Hamner, K.C. and Bonner, J.: Bot. Gaz. 100, 388-431 (1938)

- Hartmann, K.M.: Photochem. Photobiol. 5, 349-366 (1966)
- Hedley, C.L. and J.L. Stoddart: J. Exp. Bot. 22, 239-248 (1971)
- Hendricks, S.B. and H.A. Borthwick: Proc. Nat. Ac. Sc. USA 58, 2125-2130 (1967)
- Hess, D.: Planta 54, 74-94 (1959)
- Hodson, H.K. and K.C. Hamner: Science 167, 384-385 (1970)
- Huntner, D.R., C.L. Norberg and J.H. Segel: J. Bacteriol. 114, 956-960 (1973)
- Jacqmard, A., D. Pierard and G. Bernier: XII. Intern. Congr. Bot. Abstr. Leningrad (1975)
- Jindal, K.K. and R.N. Singh: B.P.P., 301-307 (1976)
- Kandeler, R.: Fortschr. Bot. 34, 211-226 (1972)
- Kandler, O. und F. Schötz: Z. Naturforsch. 116, 708-718 (1956)
- Kawashima, N. and S.G. Wildman: Ann. Rev. Plant Physiol. 21, 325-358 (1970)
- Kelday, L.S. and D.J.F. Bowling: Ann. Bot. 39, 1023-1027 (1975)
- Kendrick, R.E.: Planta (Berl.) 102, 286-293 (1972)
- Kendrick, R.E. and C.J.P. Spruit: Planta (Berl.) 120, 265-272 (1974)
- Kenney, F.T.: Science 156, 525 (1967)
- Key, J.L. and J. Ingle: Proc. Nat. Ac. Sci. USA, 52, 1382 (1964)
- Kinet, J.M., M. Bodson, A.M. Alvinia and G. Bernier: Z. Pflanzenphysiol. 66, 49-63 (1971)

- King, R.W. and B.G. Cumming: *Planta* 108, 39-57 (1972)
- King, R.W. and J.A.D. Zeevaart: *Plant Physiol.* 51, 727-738 (1973)
- Kirkland, L. and H.B. Posner: *Ann. Meet. Am. Soc. Plant Physiol. Abstr.* 10 (1974)
- Klautke, S.: *Diss. Univ. München* (1972)
- Klautke, S. und W. Rau: *Planta (Berl.)* 112, 25-34 (1973)
- Klautke, S. und W. Rau: *Ber. Dt. Bot. Ges.* 86, 571-576 (1974)
- Kopcewicz, J.: *Z. Pflanzenphys.* 67, 373-376 (1972)
- Kopcewicz, J. and Z. Porazinski: *Biol. Plant.* 16, 132-135 (1974)
- Kuntz, G.: *Diss. Univ. München*, (1972)
- Läuchli, A., U. Lüttge and M.G. Pitman: *Z. Naturforsch.* 28c, 431-434 (1973)
- Lambin, P., D. Rochu and J.M. Fine: *Anal. Biochem.* 74, 567-575 (1976)
- Lang, A. und G. Melchers: *Planta* 33, 653-702 (1943)
- Lang, A. und G. Melchers: *Z. Naturforsch.* 3b, 108-111 (1948)
- Lang, A.: *Naturwiss.* 43, 544 (1956)
- Lang, A.: in: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, XV/1, 1380-1536 (1965)
- Latzko, E. and M. Gibbs: *Z. Pflanzenphys.* 59, 184-194 (1968)
- Lincoln, R.G., D.L. Mayfield and A. Cunningham: *Science* 133, 756 (1961)
- Liverman, J.L. and J. Bonner: *Bot. Gaz.* 115, 121-128 (1953)

- Loomis, W.D. and J. Battaile: Phytochem. 5, 423-438 (1966)
- Liverman, J.L. and A. Lang: Plant Physiol. 31, 147-150.
(1956)
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall:
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- Mahon, Mac D.: Plant physiol. 55, 815-821 (1975)
- Martin, C. and K.V. Thimann: Plant Physiol. 46/ Suppl. 51,
(1970)
- Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co.,
Berlin (1968)
- Mac Donald, J. and R.J. Ellis: Nature 222, 791-792 (1969)
- Meijer, G.: Acta Bot. Neerl. 6, 395-406 (1957)
- Melchers, G. und H. Claes: Naturwiss. 31, 249 (1943)
- Melchers, G. und A. Lang: Naturwiss. 30, 589-590 (1942)
- Metzner, H.: Planta 45, 493-534 (1955)
- Mertz, D.: Plant Physiol. 56, Suppl. 413 (1975)
- Michniewicz, M. and A. Kamienska: Naturwiss. 52, 623 (1965)
- Mirault, M.E., K. Scherrer and L. Hansen: Eur. J. Biochem.
23, 372-386 (1971)
- Miyoshi, Y., M Furuya and A. Takimoto: Plant & Cell Physiol.
15, 1115-1123 (1974)
- Mohr, H.: Photochem. Photobiol. 5, 469-483 (1966)
- Mohr, H., H. Drumm und H. Kasemir: Ber. Dt. Bot. Ges. 87,
49-69 (1974)

- Parker, M.W., S.B. Hendricks, H.A. Borthwick and N.J. Scully:
Bot. Gaz. 108, 1-26 (1946)
- Parker, M.W., S.B. Hendricks and H.A. Borthwick: Bot. Gaz.
111, 242-252 (1950)
- Parthier, B.: B.P.P. 166, 555-560 (1974)
- Peterson, J.I., F. Wagner, S. Siegel and W. Nixon:
Anal. Biochem. 31, 189-203 (1969)
- Pieterse, A.H. and L.J. Müller: Plant & Cell Physiol. 18,
45-53 (1977)
- Rajalakshmi, S., H. Liang, D. S. R. Sarma, R. Kisilevsky
and E. Farber: Biochem. Biophys. Res. Comm. 42,
259-265 (1971)
- Rau, W.: Ber. Dt. Bot. Ges. 88, 45-60 (1975)
- Richter, J., D. Reichenbächer und H.-J. Spohn: B.P.P. 167,
285-290 (1975)
- Ross, C.: in: G. Bernier: Cellular and Molecular Aspects
of Floral Induction. London (1970)
- Salisbury, F.B.: Plant Physiol. 32, 600- 608 (1957)
- Salling, G.: Planta (Berl.) 98, 50-62 (1971)
- Sawhney, S., N. Sawhney and K.K. Nanda: Plant & Cell Phys.
17, 751-755 (1976)
- Schneider, M.J., H.A. Borthwick and S.B. Hendricks: Amer.
J. Bot. 54, 1241 (1967)
- Schneider, M.J. and W.R. Stimson: Proc. Nat. Acad. Sci. USA
69, 2150-2154 (1972)
- Schopfer, P.: Ber. Dt. Bot. Ges. 86, 271-286 (1973)
- Schrott, E.L.: Diss. Univ. München (1973)
- Schuster, M. und R. Kandeler: Z. Pflanzenphysiol. 63/4,
308-315 (1970)

- Searle, N.E.: Plant Physiol. 40, 261-268 (1965)
- Sherwood, S.B., J.D. Evans and C. Ross: Plant & Cell Phys. 12/1, 111-116 (1971)
- Siegelman, H.W. and Hendricks, S.B.: Plant Physiol. 32, 393-398 (1957)
- Siegel, M.R und H. D. Sisler: B.B.A. 87, 70 (1964)
- Spencer, P.W.: Plant Physiol. 52, 151-155 (1973)
- Srivastava, G.C. and G.S. Sirohi: Physiol. Plant. 33, 182-184 (1975)
- Stanners, C.P.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 758-764 (1966)
- Stolwijk, J.A.J. and J.A.D. Zeevaart: Proc.Kongl. Needl. Acad. Wetensch. 58, 386-396 (1955)
- Takimoto, A.: in: Physiology of Flowering in Pharbitis nil, ed. S. Imamura, Tokyo (Japan) (1967)
- Teltscherova, L., F. Seidlova and J. Krekule: Biol. Plant. 9, 234-244 (1967)
- Theimer, R.R., G. Anding und P. Matzner: Planta (Berl.) 128, 41-47 (1976)
- Timberlake, W.E. and D.H. Griffin: Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 216-221 (1973)
- Tobin, E.M. and A.O. Klein: Plant Physiol. 56, 88-92 (1975)
- Vince, D.: in: Phytochrome, ed. K. Mitrakos and W.Shropshire jr., Acad. Press, London and N.Y., 257-291 (1972)
- Wagner, E., S. Frosch and G.F. Deitzer: J. Interdiscipl. Cycle Res. 5, 240-246 (1974)
- Wassink, E.C. and W. Sytsema: Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen 58, (7), 1-6 (1958)
- Wellensiek, S.J.: Proc. Kon. Needl. Acad. Wetensch. 62, 195-203 (1959)

Wellensiek, S.J.: Z. Pflanzenphysiol. 63/1, 25-30 (1970)

Wildes, R.A., M.G. Pitman and N. Schäfer: Planta (Berl.)
128, 35-40 (1976)

Zenk, M.H.: Ber. Dt. Bot. Ges. 83, 325-344 (1970)

Herrn Prof. Dr. W. Rau, der mir freundlicherweise das Thema überließ, möchte ich für seine vielen anregenden Diskussionsbeiträge und Hinweise und seine stetige Hilfsbereitschaft bei allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen meinen herzlichsten Dank aussprechen.

Herr Gartenmeister P. Debbert und Fräulein T. Driver haben mich in dankenswerter Weise bei der Anzucht und Betreuung der Versuchspflanzen unterstützt.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch den Herren Dr. Süss und Dr. Fuchsbichler von der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau in München für die zeitweilige Bereitstellung der automatischen Verbrennungsanlage Oxyamat.

Lebenslauf

Geboren wurde ich, Erich Warm, am 28. Dezember 1946 als Sohn der Kaufleute Margarete Warm, geborene Schwaiger und ihres Ehemannes Heinz Warm in München.

Nach dem Besuch der Volksschule in München-Pasing, trat ich 1958 in die Oberrealschule, späteres Max-Planck-Gymnasium in München-Pasing über, an dem ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Oktober 1967 bis April 1969 leistete ich meinen Wehrdienst ab, wobei ich die Aufgaben eines Fernmeldedefeldwebels erfüllte.

Im Sommersemester 1969 begann ich mit dem Studium der Biologie und Chemie an der Universität München, das ich im Juni 1973 mit dem Diplom in Biologie abschloß.

Unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rau begann ich im gleichen Monat im Botanischen Institut der Universität München mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Am selben Institut war ich von 1972 bis 1974 als studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft, seit April 1976 als wissenschaftlicher Angestellter beschäftigt. Zur Zeit bin ich Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten.

